

روشهای عملی در بیولوژی ملکولی – کارشناسی ناپیوسته علوم

- بافر های مورد نیاز در آزمایشگاه بیولوژی مولکولی

اولین وظیفه فرد در آزمایشگاه مولکولار بیولوژی تهیه بافر های مورد نیاز میباشد. هموآکنشهای بیولوژی در بافر مخصص و صاف انجام میشوند. معمولاً مواد اصلی بافر ها را در آزمایشگاه بصورت ذخیره (Stock) تهیه میکنند و بافر های مورد نیاز روزانه را از مواد ذخیره تهیه مینمایند. بعضی از مواد ذخیره و مولاریته آنها به این شرح است:

| نام ماده | مولاریته (غلظت) | نام ماده | مولاریته (غلظت) |
|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Ammonium Acetate | 10M | NaCl | 5M |
| Tris pH (8, 7.5 , 7.4) | 1M | CaCl ₂ | 1M |
| NaOH | 5N | EDTA | 0.5M |
| Ethidium bromide | 1mg/ml | SDS | 10% |
| X-gal | 20mg/ml | KAc | 5M |
| IPTG | 200mg/ml | NaAc | 3M |

برای تهیه محلول کار از مواد ذخیره از فرمول زیر استفاده میشود

$$M1V1=M2V2$$

M1 مولاریته ماده ذخیره V1 حجم ماده ذخیره که باید برای بافر برداشته شود

M2 مولاریته بافر مورد نیاز V2 حجم بافر خواسته شده

مثلاً " برای تهیه ۵۰ میلی لیتر TE بافر (۱۰ میلی مولار تریس و ۱ میلی مولار EDTA) چنین عمل میکنیم :

$$50 \times 10 = ? \times 1000, 500:1000 = 0.5cc (500 \mu l) \text{ Tris}$$

$$50 \times 1 = ? \times 500, 50:500 = 0.1cc (100 \mu l) \text{ EDTA}$$

روش کار: 500µl از بافر تریس و 100µl از EDTA را در ظرف مدرج (لوله فالکن) ریخته و حجم آن را به 50ml میرسانیم .

۳- تهیه محیط LBbroth برای کشت باکتری (Ecol)

هدف از آموزش این قسمت تهیه محیط مایع برای کشت باکتریهای مورد استفاده در کار های بیولوژی مولکولی میباشد

۱- مواد زیر را وزن کرده درون ارلن مایر ریخته و روی Stirrer مخلوط کنید

تریپتون ۲/۵ گرم سدیم کلراید ۲/۵ گرم

عصاره مخمر ۱/۲۵ گرم آب مقطر ۲۵۰ میلی لیتر

۲- pH محیط را مساوی ۷/۵ تنظیم کنید و سپس آن را اتوکلاو نمایید. مقدار لازم از آن را درون لوله مناسب ریخته (در صورت نیاز آنتی بیوتیک مناسب به آن اضافه نمایید) و بصورت استریل (کنار شعله) یک کلنی از سلول مورد نظر را در آن کشت داده و یک شب در ۳۷ درجه آن را Shake کنید.

۴- تهیه آگار پلیت هدف از انجام این کار تهیه محیط کشت جامد برای کشت باکتریها میباشد.

به محیط LB مقدار ۱/۵ درصد وزنی پودر آگار آگار اضافه کرده و روی شعله قرار دهید تا خوب بجوشد تا آگار کاملاً ذوب شده و محلول شفاف بدست آید سپس آن را اتوکلاو کنید.

مقدار 100µg / ml آمپی سیلین (یا هر آنتی بیوتیک مناسب دیگر) به آن اضافه کنید.

محیط را داخل چند پلیت تقسیم کرده و در حرارت اتاق قرار داده تا آگار سفت شود سپس آنها را لای کاغذ پیچیده و تا هنگام اسفاده درب رودت ۴ درجه نگهداری نمایید.

۵- تهیه آنتی بیوتیک های مورد نیاز کارگاه :

الف) 500mg آمپی سیلین (یک ویال) رادر ۵ سی سی آب مقطر استریل حل کنید غلظت آن 100mg/ml و هر یک رو لیتر از این محلول حاوی 100µg آمپی سیلین است. آمپی سیلین با غلظت نهایی 100µg/ml مصرف میشود برای هر میلی لیتر محیط کشت (LB broth) آگار پلیت (یک میکرو لیتر از این محلول استفاده میشود).

ب) تتراسیکلین (ویال یا کیسول) را با غلظت 25mg/ml در لوله های یک میلی لیتری تقسیم کرده فریزر کنید دایم آن آنتی بیوتیک با غلظت نهایی 12.5µg/ml مصرف میشود. برای هر ویلی لیتر محیط کشت (LB broth) آگار پلیت (۵ میکرو لیتر از این محلول استفاده میشود) میتوان محلول ذخیره تتراسیکلین را با غلظت 2.5mg/ml تهیه نمود سپس برای هر میلی لیتر محیط یک میکرو لیتر از محلول ذخیره اضافه نمود).

۶- تهیه سلول پذیرا (Competent cell)

هدف از آموزش این قسمت کسب مهارت برای تهیه سلول باکتری است بطوری که طی پروسه ای که روی آن انجام میگیرد باکتری زنده بماند و پلاسمید (Circular DNA) بتواند وارد آن شود و بهر زمان کلونیم کلازید و متعاقب آن شد و گرم آبی (Heat shock) به سلول وارد میشد و تغییراتی در سطح سلول ایجاد میشود و DNA پلاسمیدی از طریق منافذی که روی سطح سلول ایجاد شده اند وارد آن میگردد.

روش کار:

- ۱- یک کلنی از باکتری مورد نظر را در ۳ میلی لیتر محیط LB کشت داده و یک شب در ۳۷ درجه روی شیکر انکوبه کنید
۲. یک حجم از کشت شبانه باکتری مورد نظر را در ده حجم محیط LB کشت دهید (بنا به دلایلی که بعداً توضیح داده میشود در این کارگاه) از دو سویه HB101 و XL1-blue باکتری E.coli که خصوصیات آنها نیز توضیح داده خواهد شد استفاده میگردد)
۳. مدت ۲.۵ ساعت در حرارت rpm مناسب آن را Shake کنید تا به OD600 = 0.6 برسد
۴. مقدار یک میلی لیتر آن را به لوله میکرو فیوز انتقال دهید
۵. لوله حاوی سلول را ده دقیقه روی یخ قرار دهید

۶. مدت ۵ دقیقه با 3500rpm سانتریفیوژ کنید (بهتر است در ۴ درجه انجام شود)

۷. مایع رویی را خالی کرده ولوله را وارونه روی کاغذ جاذب الرطوبه قرار دهید تا آب آن خارج شود

۸. رسوب را بایک سوم حجم اولیه از محلول 100mM CaCl₂ سوسپانسیون کنید محلول نباید ورنگش شود بلکه به آبی ضد ربه انگشت آن را د ل کنید) و ده دقیقه روی یخ قرار دهید

۹. مانند مرحله ۵ آن را سانتریفیوژ کرده محلول رویی را خالی کنید

۱۰. رسوب را با یک دوازده ونیم حجم اولیه محلول CaCl₂ سوسپانسیون کنید (با ضربه دست)

آن را درون میکروفیوژ های مناسب تقسیم کرده و برای Transformation استفاده کنید.

۷- Transformation (انتقال Plasmid DNA به باکتری زنده)

هدف از آموزش این قسمت کسب مهارت لازم برای انتقال پلاسمید به سلول باکتری میباشاید که در بیولوژی مولکولی از اهمیت بالایی برخوردار است. برای کار کردن با ژنها باید حتماً در یک پلاسמיד کلون شده و سپس پلاسמיד نوترکیب (Recombinant plasmid) به سلول باکتری منقل شود تا پس از همانند سازی پلاسمید، ژن (DNA) کلون شده در پلاسمید نیز به تبع آن همانند سازی کند.

۱. سلول پذیرا (Competent cell) را روی یخ قرار دهید

۲. Plasmid DNA مورد نظر را (5ng) به آن اضافه کرده خوب مخلوط کنید (بنا به دلایلی که بعداً توضیح داده میشود و این کارگاهها از دوپلاسمید pBR322 و Bluescript که خصوصیات آنها نیز توضیح داده خواهد شد استفاده میگردد)

۳. - لوله حاوی سلول پذیرا (Competent cell) را مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار دهید

۴. - واکنش را مدت ۴۰ ثانیه در آب گرم ۴۲ درجه قرار دهید (شوگ گرما)

۵. - مدت ۱-۲ دقیقه روی یخ قرار دهید

۶. - مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط LB (بدون آنتی بیوتیک) به آن اضافه کرده و ۶۰-۴۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه کنید (باکتری E.coli هر ۲۰ دقیقه یک نسل تکثیر میکند و در اینجا به آن فرصت داده میشود تا دو یا سه نسل تکثیر نماید) .

۷- بصورت زیر روی آگار پلیت پخش کنید (توجه به محتوای لوله را روی پلیت خالی کرده و با spreader را روی سطح آگار داخل پلیت پخش کنید)

پلیت A: Competent cell+ plasmid و آنتی بیوتیک مناسب

پلیت B: Competent cell (آگار حاوی آنتی بیوتیک است)

پلیت C: Competent cell (آگار فاقد آنتی بیوتیک است)

۸. - پلیت را به انکوباتور منقل کرده و در آب آنها را نیمه باز بگذارید تا سطح پلیتها خشک شود

۹- پلیت ها را بصورت وارونه يك شب در حرارت ۳۷ درجه انكوبه كنيد

۱۰- اگر پروسه كار خوب انجام شده باشد بعد از ۱۲ ساعت روي سطح پلیت كلني ها ظاهر میشوند

۱۱- **تفسير نتايج** اگر كار درست انجام شده باشد د باو د روي پلیت هاي A كلني با كلني B كه رده باشد د و ل ي روي پلیت B كلني با كلني C مشاهده نگرديد. رشد كلني باكتريايي روي پلیت B به اين معناي ت كه با كلني م ورد اسد تقاده ق بلايا با ك پلاسد مید حاوي ژن مقاومت به آنتي بيوتيك ترانسفرم شده است در اينصورت كلني هايي كه روي پلیت A ظاهر شده اند فاقد اعتبار میباشد. اگر روي پلیت C كلني با كلني B رشد نكند به اين معني است كه Competent cell خراب بوده و باكتريها در طول پروسه كار مرده اندو نبايد انتظار داشته باشيم كه روي پلیت A هم كلني باكتري رشد كند. كلني هاي باكتريايي كه روي پلیت A رشد میکنند كلني هاي حاوي پلاسميد مورد نظر هستند.

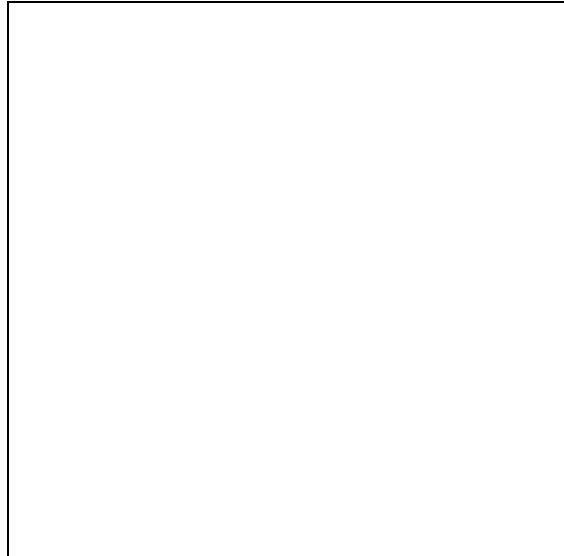
درس سوم

۸- پلاسميد ها :

پلاسميد يك مولكول dsDNA حلقوي است كوارد باكتري ميشود و همانند سازي آن داخل سيتوپلاسم با كلني و بطورمس نقل از ژنوم با كلني انجام میگيرد. به آساني هم از باكتري استخراج ميشود. هر پلاسميد داراي يك Origin of Replication (ori) (منشاء همانند سازي) است كه همانند سازي پلاسميد از آن نقطه شروع ميشود. قسمتي از ترادف پلاسميد كه براي تعدادي از Restriction enzyme فقط يك جايجاه زيمنه دارد و اين زيمنه ها در قسمتهاي ديگرت رادف پلاسد مید جايجاه به رش ندارند Multiple Cloning Site (MCS) (ميشود و ب رايتهيد Recombinant DNA) انوا تقاده ميشود و يعنى مولكول DNA جي در اين قسممت كلاون (Clone) میگردد. تعدادي از پلاسميد ها در طبيعت يافت ميشوند (در باكتريها و مخمرها) ولي در مقايسه با كروموزوم سلول ميزبان بسيار كوچكتر مي باشند و اغلب در خارج كروموزوم باكتري ديده ميشوند. (تعدادي پلاسميد ها با راي كارهاي خاصي در آزمايشگاه طراحي و ساخته شده اند). اگر چه پلاسميدها براي زندگي سلول باكتري ضروري نيستند ولي حاوي ژن مقاومت به يك آنتي بيوتيمباشند كه با راي كارهاي مهندس ي ژنتيك لازم وضويعي لپيازبپلاسد میدها تع داد زيادي كمي در داخل سلول با كلني دارند كه به اين ام High copy number plasmid گفته ميشوند (همانند سازي اين پلاسميد ها به كروموزوم با كلني بستگي ندارد) و Relaxed Plasmid م گفته ميشوند. تعداد ديگري از پلاسميدها تعداد كمي محدود تري در داخل سلول با كلني ايجاد ميكنند كه به اين ام Low copy number plasmid معروف هستند و با كلني شديد "Replication آنها را كنترل ميكنند و به Stringent Plasmid هم معروف ميباشند. با تغييراتي كه در Sequence پلاسد مید ها ايجاد ميكنند صفات خاصي در آنها ايجاد مي آيد كه در مهندسي ژنتيك اسد تقاده ميشود و چنانچه Ori دو پلاسد ميلاز يك منشأ باشد هنگام ترانسفورماسيون با هم رقابت كرده و فقط يكي از آنها وارد با كلني ميشود و اما اگر منشأ ori با هم اختلاف داشته باشد هنگام ترانسفورماسيون دو پلاسميد نيز ميتوانند وارد يك سلول بشوند (اين مسئله در كارهاي كلونينگ اهميت خاصي دارد).

كارهاي عملي در اين كارگاههاي آموزشي با دو پلاسميد انجام میگيرد:

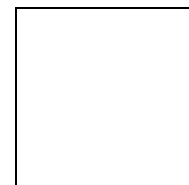
الف) **پلاسميد pBR322** اين پلاسميد توسط فرانسيسكو بوليوار و همكاران طراحي و ساخته شده است و همه خصوصيات يك پلاسد ميد خوب را دارا ميباشد. وزن مولكولي پايين (4363bp) دارد و با راي تع داد ي از Restriction Enzyme فقط يك جايجاه به رش دارد اين پلاسد ميد داراي دوژن مقاومت به آمپيسيكلين و تتراسايكلين هنگامي كه وارد با كلني ميشود و با كلني نسبت به دو آنتي بيوتيك ذكور مقاومت ميشود. قسمتي از ترادف اين پلاسميد (705bp) را كه براي ادامه زندگي آن ضروري نميباشد با آنزيم HaellI رش داده و حذف كرده اند و از آن پلاسميدي بنام pT153 ساخته اند كه همانند سازي آن ۳-۵ برابر پلاسميد PBR322 ميباشد.



تصویر بزرگتر

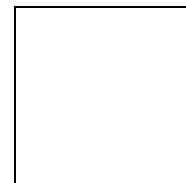
شکل ۱ نقشه ژنی پلاسمید PBR322

پلاسمید Bluescript sk همانطور که در شکل دیده میشود ترادف ژن Lacz⁺ (قسمت N terminal ژن β -galactosidase) بطوری روی پلاسمید تعبیه شده است که Multiple Cloning Site این پلاسمید قسمتی از ترادف ژن مذکور میباشد. جایگاه به روش آنزیمها در قسمت های مختلف ترادف پلاسمید PBR322 قرار دارند (یکه هندسی ژنتیک برای انتخاب کلنی های سفید باکتریایی حاوی Recombinant DNA تفاده میشود و در دو طرف MCS پلاسید پروموتور فاژهای T3 و T7 قرار داشت که ژن کلون شده در قالب ریس ب Orientation آن میتوان توسط هر یک از پروموتورهای مذکور بیان (Express) نمود.

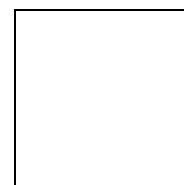


شکل ۲- نقشه ژنی پلاسمید Bluescript sk (فاژمید)

این پلاسمید دارای دو Original of Replication است که یکی از باکتری E.coli و دیگری از فاژ F1 گرفته شده است که به این علت فاژمید هم گفته میشود. این پلاسمید برای تولید ssDNA هنگام Sequencing یک قطعه DNA هم قابل استفاده میباشد. در Bluescript (M13) جایگاه به آن زیم SacI و لا فاصد له در Downstream پروموتور فاژ T3 قرار دارند. برای کلونینگ سایدیت (Bluescript ks (M13) در orientation مذکور الف پلاسید مید (M13)-Bluescript sk قرار گرفته است.



شکل ۳- اشتقاق پلاسمید (فائز مید) Bluescript II SK از فائز landa zap



شکل ۴ site Multiple cloning پلاسمید (فائز مید) SK Bluescript II

۹- استخراج پلاسمید در مقیاس کم (Minipreparation)

هدف از آموزش این قسمت کسب مهارت برای استخراج پلاسمید از داخل باکتری می باشد و همانطوریکه قبلاً گفته شد این کار در مهندسی ژنتیک و بیولوژی مولکولی از اهمیت زیادی برخوردار است. استخراج Plasmid DNA روش آلفا لاین و به صورت Miniprep درمورد وارد Colony screening استفاده می شود و برای کارهای حساس تر پلاسید به صورت Large scale استخراج می گردد. برای این کار فقط Miniprep انجام می شود. برای استخراج پلاسمید سلول باکتری با محلول GTE (گلاوکس، تریس، EDTA) لیز شده و محتویات آن آزاد می شوند. Genomic DNA و پروتئینهای سلولی را با محلول قلیا (NaOH و SDS) دناتوره کرده (در این روش DNA سوپر کوئل دناتوره نمی شود). لیز با اسیدی کردن محیط و ایداد سد رما Genomic DNA پروتئینها را رسوب می دهد. این پروسه Plasmid DNA بصورت محلول باقی میماند که توسط سانتریفیوژ آنرا از فاز آلی (پروتئینها) جدا می کنیم.

روش کار:

۱- مقدار ۱/۵ میلی لیتر کشت شبانه (باکتری حاوی پلاسمید) را بمدت دقیق ۴۵۰۰rpm سانتریفیوژ کنید. عده ای معتقدند چنانچه رسوب را با محلول STE سوسپانسیون کرده و دوباره سانتریفیوژ کنیم (شستشو دهیم) واکنش های آنزیمی بهتر انجام میشود

[(STE = 100mM NaCl , 10 mM Tris (pH=8) , 1mM EDTA (pH=8)]

۲- رسوب را در ۱۰۰µl محلول STE سوسپانسیون (محلول روی یخ سرد شده باشد)

محلول ۱ : ۱۰۰ pH EDTA 10 mM , Tris 25mm , glucose ۸ mM

۳- میکرو فیوژ حاوی واکنش را مدت ۱۰-۵ دقیقه در هوای اتاق قرار دهید

۴- مقدار 200μl از محلول II تازه تهیه شده به لوله واکنش اضافه کرده ، درب لوله را ببندید و با وارونه کردن آن محلول را خوب مخلوط کنید
۵ دقیقه روی یخ قرار دهید.

محلول II : ۰.۲% SDS , 1% NaOH , N

۵- مقدار 150μl از محلول III (سرد شده روی یخ) به لوله واکنش اضافه کنید و درب لوله را بست و به آهستگی ۵ دفعه آن را وارونه کنید و مدت ۱۵ دقیقه روی یخ قرار دهید.

محلول III : ۶۰ میلی لیتر 5M AcoK , اسید استیک ۱۱/۵ میلی لیتر , آب مقطر ۲۸/۵ میلی لیتر (این محلول دارای ۳مولار پتاسیم و ۵ مولار استات است) وقتی این محلول به واکنش اضافه میشود باید یک رسوب سفید رنگ در داخل لوله پدیدار گردد .

۶- مدت ۲۰ دقیقه با 12000xg آن را سانتریفیوژ کنید

۷- محلول رویی (تقریباً " ۴۵۰ میکرو لیتر) را به لوله دیگر انتقال دهید(حاوی پلاسמיד میباشد)

۸- سدیم استات با غلظت نهایی 0.3M به آن اضافه کنید (عده ای این مرحله را ضروری نمیدانند)

۹- دو برابر حجم آن اتانل مطلق سرد اضافه کنید

۱۰- مدت ۵ دقیقه آن را سانتریفیوژ کنید تا plasmid DNA رسوب کند . الکل را حذف کنید و (حتمالاً لوله را وارونه روی کاغذ جذب الیوتیه قرار دهید) .

۱۱- روی رسوب الکل ۷۰درجه (۱۰۰ میکرو لیتر) اضافه کنید و آن را ورتکس کنید بطوریکه pellet کنده شده و در الکل شناور شود

۱۲- مدت ۳ دقیقه در حرارت اتاق آن را سانتریفیوژ کنید (شستشو دادن با الکل)

۱۳- الکل را خالی کرده و رسوب را در حرارت ۷۰ درجه خشک کنید .

۱۴- رسوب را در ۵۰ میکرو لیتر آب یا بافر (TE) حل کنید

TE= 10mM Tris pH 8 , 1mM EDTA pH 8

۱۰- استخراج پلاسמיד در مقیاس بالا (Large scale Plasmid DNA preparation) :

۱. مقدار ۵۰۰ میلی لیتر کشت شبانه را با 4000g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کنید. مایع رویی را خالی کرده و بوله را وارونه روی کاغذ خشک کن قرار دهید تا درناژ شود. رسوب را با STE سوسپانسیون نموده و دوباره سانتریفیوژ کنید سپس لوله وارونه قرار داده تا درناژ شود.

[(STE = 100mM NaCl , 10 mM Tris- base (pH=8) , 1mM EDTA (pH=8)]

۲. رسوب را در ۱۰ میلی لیتر محلول I حل کنید.

Solution I: 50 mM glucose , 25 mM Tris (pH 8), 10 mM EDTA

۳. آن را خوب سوسپانسیون کنید و ۱۰ دقیقه در هوای اتاق قرار دهید

۴. مقدار ۲۰ میلی لیتر از محلول II تازه تهیه شده به آن اضافه کرده درب لوله را ببندید و با وارونه کرده آن محلول را خوب مخلوط کنید دو ۵ دقیقه روی یخ قرار دهید محلول

Solution II: 0.2N NaOH, 1% SDS

۵. مقدار ۱۵ میلی لیتر از محلول III به به واکنش اضافه کنید و ۱۵ دقیقه لوله را روی یخ قرار دهید

Solution III : 60 ml of 5M ACOK , 11.5 ml of Acetic Acid , 28.5 ml of ddH₂O

(این محلول دارای ۳ مولار پتاسیم و ۵ مولار استات است) این محلول اضافه می شود باید دیک رسوب سفید رنگ پدیدار گردد (میتوان با پروخالی کردن محلول توسط پیپت پرتونیها را شکست)

۶. مدت ۲۰ دقیقه با 20000xg آن را سانتریفیوژ کنید

۷. محلول روبی را (تقریباً "مقدار ۱۵ میلی لیتر) به لوله جدید انتقال دهید

۸. مقدار ۰.۶ حجم اولیه (۱۲ میلی لیتر) ایزو پروپانل به آن اضافه کنید و خوب مخلوط کرده و ۱۵ دقیقه در حرارت اتاق قرار دهید

۹. در حرارت اتاق و مدت ۱۵ دقیقه آن را سانتریفیوژ کنید تا plasmid DNA در ته لوله رسوب کند (توجه : اگر در ۴ درجه انجام شود نمک ها رسوب میکنند)

مابقی رویی را حذف کنید (حتماً لوله را وارونه قرار دهید) و رسوب را با الکل ۷۰ درجه و در حرارت اتاق شستشو دهید (مقدار ۱۰ میلی لیتر الکل ۷۰ درجه به هر لوله اضافه کرده و با 17000g بمدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید) لوله را خالی کرده و آن را در حرارت ۷۰ درجه خشک کنید. رسوب را با ۸ میلی لیتر آب یا بافر TE حل کنید .

۱۱- هضم DNA با آنزیم های محدودکننده (restriction digestion) (کارها روی یخ انجام گیرد):

هر یک از آنزیمهای محدودکننده (برش دهنده) ترادف خاصی را روی رشته DNA شناسایی کرده و دورشته DNA را برش میدهند. آنزیمهای محدودگر در مهندسی ژنتیک از اهمیت بالایی برخوردارند و در حقیقت شبیه چاقوی جراحی برای مهندسان ژنتیک میباشد. در جدول آنزیمها مراجعه شود).

۱- مقدار پلاسمید را تخمین بزنید (یک واحد آنزیم مقدار یک میکروگرم DNA در حرارت مناسب در مدت یک ساعت هضم میکند دو یک میکروگرم DNA را در یک واکنشی به حجم ۲۰-۳۰ میکرولیتر با آنزیم هضم کنید)

۲- با آب مقطر حجم آن را به ۱۸ میکرولیتر (یا هر حجم مورد نظر) برسانید

۳- لوله واکنش را spin کنید

۴- مقدار ۲ میکرولیتر از 10x Reaction buffer به واکنش اضافه کنید (غلظت نهایی بافر 1x باشد)

۵- با استفاده از سرمپلر استریل و سرد مقدار آنزیم مورد نظر را به واکنش اضافه نمایین (مقدار آنزیم باید در حجم نهایی در نظر گرفته شده باشد).

۶- با ضربه نوک انگشت واکنش را مخلوط کرده و سپس spin نمایید.

۷- مدت يك تا دوساعت در حرارت مناسب انكوبه كنيد

مقدار ۱۵ ميكروليتر از واكنش را با ۳ ميكرو ليتر loading buffer مخلوط كرده و روي ژل آگارز با درصد مناسب الكتروفورز نماييد (از Intact plasmid DNA بعنوان كنترل واكنش روي ژل در كنار نمونه الكتوفورز شده و توجه: اگر DNA هضم نشده است آن را P.C.I extraction نموده و با الكل رسوب داده و واكنش را تكرر كنيد).

درس چهارم

الكتروفورز DNA

براي تاييد انجام كارهاي مهندسي ژنتيك با يد تغييراتي كه روي DNA ايجاد شده است رويت گردند، مشاهده DNA متعاقب الكتروفورز روي ژل آگارز يا پلي اكريلاميد و رنگ آميزي با اتيديوم برومايد امكان پذير خواهد بود. براي انتخاب درصد آگارز از جدول شماره ۲ استفاده ميشود:

جدول شماره ۲ - قدرت جداسازي مولكولهاي DNA توسط غلظتهاي مختلف آگارز

| درصد آگارز | قدرت جداسازي DNA |
|------------|------------------|
| 3 | 100-1000bp |
| 2 | 200- 1500bp |
| 1.5 | 300- 3000bp |
| 1 | 500 – 5000bp |
| 0.8 | 1000- 7000bp |
| 0.6 | 10 – 30kbp |
| 0.4 | 30 – 50kbp |

۱۲- تهيه ژل آگارز

۱- قالب ژل را آماده كنيد

۲- شانه اي با دنده هاي مناسب روي قالب قراردهيد

۳- حجم ژل مورد نظر را تعيين كنيد (اندازه گيري طول و عرض قالب و قطر ژل مورد نظر)

۴- پودر آگارز را وزن كنيد

۵- آگارز را در بافر 1xTBE حل كنيد و آن را حرارت داده تا خوب بجوشد و قبل از خنك شدن به ازاي هر ۰.۰ اميلي ليتر ژل يك ميكروليتر از محلول 10mg/ml اتيديوم برومايد اضافه كنيد سپس آن را خوب مخلوط کرده و داخل قالب بريزيد

1xTBE= 89mM Tris base, pH8, 89mM boric acid, 2.5mM EDTA, pH8

۶- بعد از بسته شدن ژل آن را از قالب خارج کرده و داخل تانك الكتروفورز قرار دهيد

۷- هر ۵ ميكروليتر نمونه را با يك ميكروليتر بافر نمونه مخلوط کرده و داخل چاهك هاي ژل بريزيد (اين بافر حاوي «نمك ماده سد نگين كند ده مانند گليسرين يا ساكارز است كه نمونه بخوبي داخل چاهك ريخته ميشود و همچنين حاوي درصد از يك رنگ نشانه مانند دبروموفل بل و يا گزيلن سيانول ميباشد . رنگ دبروموفل بل در ژل ۱.۵ درصد همراه با 500bp و در ژل ۰.۸ درصد با 1000bp حركت ميكند)

جدول شماره ۳ : مقایسه حرکت رنگ نشانه و مارکر DNA روی ژل آگارز

| درصد ژل آگارز | حرکت تقریبی رنگ نشانه در مقایسه با مارکر | | ت تقریبی مقایسه با مارکر ی DNA در |
|---------------|--|--------------|---|
| | برومو فنل بلو | Xylen cyanol | |
| ۰.۴ | 500bp | 3 kbp | 2.5 kbp |
| ۰.۸ | 500 bp | 3 kbp | 1kbp |
| ۱ | 500bp | 3 kbp | 500 bp |
| ۱.۲۵ | 500 bp | 3 kbp | 250bp |
| ۱.۵ | 100bp | 1kbp | 250bp |
| ۲ | 100bp | 1kbp | 100bp |

جدول شماره ۴ : مقایسه حرکت رنگ نشانه و مارکر DNA روی ژل پلی آکرلامید

| د ژل پلی آکرلامید | حرکت تقریبی رنگ نشانه در مقایسه با مارکر | | حرکت تقریبی ی DNA در مقایسه با مارکر |
|----------------------|--|--------------|--|
| | برومو فنل بلو | Xylen cyanol | |
| ۳.۵ | 100bp | 500 bp | 100 bp |
| ۵ | 75bp | 250bp | 75bp |
| ۸ | 50bp | 250bp | 50 bp |
| ۱۲ | 25bp | 75bp | 25bp |
| ۱۵ | 10bp | 60bp | 25bp |
| ۲۰ | 10bp | 60bp | 5bp |

درصد

۸- بافر تانک باید کاملاً " روی ژل را بپوشاند و نمونه ها از داخل بافر درون چاهک ها ریخته شوند. از بافرهای مختلف اسد تقاده میگرد. بهتر است هنگام الکتروفورز به ازای هر میلی لیتر بافر تانک (TBE buffer) یک میکرو لیتر از اتیدیموم بروماید 10mg/ml اضافه شود.

۹- DNA دارای شارژ منفی است و برای الکتروفورز شدن باید نمونه بطرف قطب منفی باشد تا هنگام الکترو فورز به سمت قطب مثبت حرکت کند.

۱۰- تانک الکتروفورز را به منبع تغذیه وصل کنید

۱۱- پیج Current را روی ماکزیم قرار داده و ولتاژ را تنظیم کنید (10V/centimetr)

وقتی رنگ نشانه سه چهارم طول ژل را طی کرد ژل را از تانک خارج کرده بانور UV نتیجه را مشاهده کنید .

۱۳- تهیه ژل پلی آکرلامید :

قدرت تفکیک سازی این ژل بسیار بالا است و قطعات DNA با طول کم نیز در این ژل قابل رویت میباشند و بسته به در صد ژل حتی اختلاف یک باز را میتوان در قطعات DNA الکتروفورز شده مشاهده نمود .

۱. شیشه ها، شانه (Comb) و فضا سازها (Spacer) را با آب و دترژان خوب بشویید و سپس با الکل ۷۰ درصد آنها را تمیز کنید تا چربی دستها روی آنها باقی نماند (بجای پنبه از گاز استفاده کنید زیرا پرزهای پنبه روی شیشه باقی میمانند) .

۲. قالب ژل را آماده کرده و جهت جلوگیری از نشست ژل از داخل آن اطراف آن را با آگارز ۱ درصد به دقت درزگیری (Seal) نمایید .

۳. حجم قالب (cast) را (حجم ژل) با اندازه گیری طول و عرض قالب مشخص نمایید قطر ژل بسته به قطر فضا سازها یک و یک و نیم میلیمتر است (

۴. بسته به در صد ژل مورد نظر مقدار آکرلامید و بیس آکرلامید لازم را بصورت مخلوط ۲۹ درصد آکرلامید و درصد بیس آکرلامید تهیه و در بچال نگهداری میشود) داخل لوله تمیز بریزید

۵. از بافر 10xTBE با غلظت نهایی 1x اضافه کنید و با آب مقطر به حجم مورد نظر برسانید

۶. مقدار میکا رولیت را آمونیدوم پرسد و لفات ۰.۵ درصد دویگ رولیت را مخلوط TEMED آن اضافه کنید (۰.۵ داشت ته باشد یک ۰.۵ مونومرهای آکرلامید و بیس آکرلامید در حال پلیمریزه شدن هستند)

۷. به آرامی محلول را در قالب از قبل آماده شده بریزید و مراقب باشید که حباب هوا وارد آن نشود زیرا حباب هوا مانع انجام الکترو فورز میشود .

۸. به آرامی شانه را داخل قالب قرار دهید تا بعد از پلیمریزه شده ژل ، درون آن چاهک هایی جهت نمونه گذاری ایجاد شود

۹. بعد از پلیمریزه شده به آرامی شانه را درآورده و چاهک ها را با آب بشویید تا اگر مونومرهای پلیمریزه نشده هنوز وجود دارد شسته شوند

۱۰. گیره پایینی را باز کنید و فضا ساز پایینی را از قالب خارج کنید

۱۱. گیره های طرفین را باز کرده و دستگاه را طوری داخل تانک مخصوص قرار دهید که قسمت بریده شده شیشه ۰.۵ روی (Notch) به سمت محفظه بالایی (تانک فوقانی) قرار گیرد

۱۲. شیشه های دستگاه (قالب) را با نصب گیره های مخصوص به طرفین تانک ، ثابت نمایید

۱۳. محفظه های بالا و پایین تانک را با 1xTBE buffer پر نمایید بطوریکه بافر روی چاهک ها را بپوشاند چنانچه ۰.۵ بند شیشه ۰.۵ قالب (محل خارج کردن فضا ساز پایینی) که در محفظه پایینی تانک قرار دارد حباب هوا مشاهده میشود با یک سرنگ پر از بافر که دارای سر سوزن کج است حباب هوا را بیرون کنید تا مانع جریان الکتریکی نشود و الکترو فورز بخوبی انجام گیرد

۱۴. محصول PCR را (همانند الکترو فورز با ژل آگارز) با بافر نمونه گذاری مخلوط کرده و توسط سرنگ هامیلتون نمونه گذاری را روی ژل انجام دهید

۱۵. محفظه بالایی تانک را به قطب منفی و محفظه پایینی را به قطب مثبت منبع تغذیه وصل کرده و الکترو فورز کنید

۱۶. بعد از خاتمه الکترو فورز (وقتی رنگ نشانه به پایین ژل رسید) جریان برق را قطع کرده و شیشه را از تانک جدا کنید. با یک تیغه فلزی نازک به آرامی بین دو شیشه فشار آورید تا دو شیشه از هم جدا شوند . ژل به یکی از دو شیشه می چسبد . به آرامی آنرا داخل آب حاوی ۱۰ میکروگرم در هر میلی لیتر اتیدیدوم بروماید قرار دهید تا بعد از چند دقیقه ژل رنگ شود .

ژل را روی دستگاه UV Transilluminator قرار داده و نوارهای های DNA را مشاهده کنید.

۱۴- PCI extraction

هدف از این کار حذف پروتئینهای موجود در محلول حاوی DNA میباشد. فنل (equilibrated phenol با pH بیشتر از ۷.۵) موجب حذف اتوده شدن پروتئینها میشود و کلرفرم نیز بقایای فنل را از محلول واکنش حذف میکند.

۱- هم حجم محلول حاوی DNA فنل اضافه کنید و مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید (فنل متعادل شده به علت 8-hydroxyquinoline ماده آنتی اکسیدان) زرد رنگ است و روی آن با یک لایه بافر تریس پوشانیده شده است هنگام استفاده از فنل زیر بافر استفاده کنید)

۲- مایع رویی (مایع شفاف) را به لوله تمیز دیگری انتقال دهید (فنل در زیر قرار میگیرد و پروتئینهای دناتوره شده بین دو لایه قرار میگیرند).

۳- هم حجم آن از مخلوط کلرفرم - ایزو آمیل الکل (۱:۲۴) اضافه کنید (زو آمیل الکل یک ماده Anti foam است و مایع کف کردن محلول میشود) و مانند مرحله قبل ادامه دهید

۴- مایع رویی را به لوله تمیز دیگر انتقال دهید و یا مانند روش زیر میتوان عمل نمود:

۵- مخلوط فنل - کلرفرم - ایزو آمیل الکل (به نسبت ۱:۲۴:۲۵) تهیه کنید

۶- حجم مساوی از مخلوط P.C.I به محلول حاوی DNA اضافه کنید و ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید

۷- محلول رویی را به لوله تمیز دیگر انتقال دهید و هم حجم آن C.I اضافه کنید و ۵ دقیقه سانتریفیوژ کنید (محلول رویی را به لوله تمیز دیگر انتقال دهید (محلول حاوی DNA است)

۹- اگر هنوز بوی فنل از آن متصاعد میشود مرحله ۷ را تکرار کنید.

۱۰- DNA را با الکل رسوب دهید (تغلیظ DNA).

Phenol-Chloroform extraction

- Use 0.01-0.50 g or fresh tissue (liver works very well) and place in a 1.5 ml microcentrifuge tube.
- Add 200-400 ul **lysis buffer** and macerate tissue.
- Add more lysis buffer if sample is too viscous.
- Microfuge for 3 min. at 10,000 rpm.
- Remove supernatant and place in a new microfuge tube. Add equal volume of buffer-equilibrated **phenol** and invert gently.
- Microfuge for 10 min. at 10,000 rpm.
- Remove upper aqueous layer with a pipettor and place in a new microfuge tube. Add equal volume of **phenol:chloroform (1:1)** and invert gently.
- Microfuge for 5 min. at 10,000 rpm.
- Remove upper aqueous layer with a pipettor and place in a new microfuge tube.
- Add equal volume of **chloroform** and invert gently.
- Microfuge for 3 min. at 10,000 rpm.
- Remove upper aqueous layer with a pipettor and place in a new microfuge tube.
- Add 1/2 volume **7.5 M NH4OAc**.

- To the new volume add enough **ethanol (100% / 200 proof)** to make the solution 66% ethanol and invert gently.
- DNA precipitate should appear.
- Wait as long as 10 min. for all samples to develop precipitate.
- Microfuge for 10 min. at 10,000 rpm.
- Carefully decant liquid so not to dislodge pellet.
- Finger flick to dislodge pellet and then fill each tube with **70% ethanol**.
- Let stand for 10 min.
- Microfuge for 10 min. at 10,000 rpm.
- Decant off liquid and use a Kimwipe to swab dry remaining fluid.
- Don't touch the pellet! Air dry pellet.
- Add 100 ul sterile **TE** to each sample, dissolve DNA, and freeze at -20°C until needed.

۱۵- رسوب DNA با الکل (تغلیظ DNA)

هدف از این کار احیای DNA بعد از استخراج و یا بعد از P.C.I. extraction میباشد و در مواقعی نیز که DNA خیلی رقیق باشد بدینوسیله آن را تغلیظ میکنیم.

۱- حجم محلول حاوی DNA را تعیین کنید (تخمین بزنید)

۲- استات سدیم با غلظت نهایی 0.3M به آن اضافه کنید.

۳- مقدار دوبرابر حجم آن الکل مطلق سرد (۲۰- یا ۷۰-) اضافه کنید

۴- مدت ۱۰ دقیقه با 12000xg سانتریفیوژ کنید رسوب سفید رنگ را میتوان در ته لوله مشاهده نمود و لازم به ذکر است که DNA داخل ص تقریباً "بی رنگ است".

۵- با وارونه کردن لوله، مایع رویی را حذف کنید و لوله را بصورت وارونه روی کاغذ جاذب الرطوبه قرار دهید تا آب آن حذف شود.

۶- مقدار ۱۰۰ میکرو لیتر الکل دلاجه به آن اضافه کنید و آن را ورتکس کنید تا رسوب DNA ته لوله کنده شده و شش ناورگردد (اگر DNA بزرگ باشد ورتکس موجب شکسته شدن آن میشود).

۷- مدت ۵ دقیقه آن را سانتریفیوژ کنید (شستن DNA)

الکل را خالی کرده و DNA را در ۷۰ درجه خشک کنید (چنانچه در این مرحله DNA خوب خشک نشود و الکل هم رآب داخل آن بماند بعداً برای کار کردن با آنزیمها دچار اشکال میشود). DNA را در مقدار بافر (آب) دلخواه حل کنید.

۱۶- احیای DNA از ژل آگارز

هدف از این قسمت کسب مهارت برای احیای DNA از روی ژل آگارز میباشد. این تکنیک در بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک اهمیت زیادی دارد و در کلونینگ و انتقال ژن استفاده میشود و لازم به ذکر است که محیط رق مختلاف این کار انجام میشود و مانند Freeze-Squeeze, paper elution, Electro elution, و... ولی فقط دو روش توضیح داده میشود :

الف) احیای DNA از روی ژل توسط کاغذ (paper elution)

- ۱- DNA مورد نظر را با ژل آگارز ۱-۲ درصد الکتروفورز کنید و اجازه دهید تانوارهای های DNA بخوبی از همدیگر تفکیک شوند
- ۲- با نور UV (طول موج ۲۵۴ نانومتر موجب آسیب DNA میشود و بهتر است از طول موج ۳۱۲ نانومتر استفاده گردد) نوارهای مورد نظر را مشاهده کرده و جلو آن را با تیغ اسکالپر تمیز علامت گذاری کنید
- ۳- در جلو band یک حفره ایجاد کنید (عرض حفره مساوی عرض band باشد)
- ۴- یک قطعه کاغذ واتمن و یک قطعه کیسه دیالیز (dialysis tubing) به اندازه حفره ببرید
- ۵- کاغذ واتمن را در جلو حفره و کیسه دیالیز را در پشت کاغذ قرار دهید
- ۶- الکتروفورز را ادامه دهید (بافر تانک را کمتر کنید بطوری که روی ژل را نپوشاند)
- ۷- وقتی DNA وارد کاغذ شد الکتروفورز را متوقف کنید
- ۸- کاغذ را جمع کرده و به لوله ۵/۵ میلی لیتری که انتهای آن سواخ شده است انتقال دهید
- ۹- توسط سمپلر مقدار مناسب بافر
- (SDS 5% , 1mM EDTA , 20mM Tris (pH=7.5) , 150mM NaCl) روی کاغذ بریزید
- ۱۰- لوله مذکور را داخل یک لوله بزرگتر قرار دهید (۱/۵ میلی لیتر) سانتریفیوژ کنید تا مایع از ته لوله کوچک به داخل لوله بزرگتر حرکت کند ، چند دفعه اینکار را تکرار کرده تا موقعی که دیگر DNA روی کاغذ واتمن مشاهده نشود (با نور UV آزمایش شود)
- ۱۱- این بافر را جمع آوری کرده و با P.C.I استخراج کرده و با الکل تغلیظ کنید

ب) احیای DNA از روی ژل آگارز (Low Melting Point (LMP

- ۱- DNA مورد نظر را با آگارز LMP ۲ درصد الکتروفورز کنید و اجازه دهید تا نوارهای DNA خوب تفکیک شوند
- ۲- با نور UV (طول موج ۲۵۴ نانومتر موجب آسیب DNA میشود و بهتر است از طول موج ۳۱۲ نانومتر استفاده گردد) band مورد نظر را مشاهده کنید
- ۳- band مورد نظر را با تیغ اسکالپر تمیز علامت گذاری کنید
- ۴- ژل را روی کاغذ سفید قرار داده و band مورد نظر را بریده به لوله تمیز دیگر منتقل کنید

۵- قطعه ژل را يك شب در فریزر ۲۰- درجه قرار دهید

۶- قطعه ژل را در حرارت اتاق قرار دهید و سپس ۵ دقیقه در آب ۶۵ درجه انکوبه کنید

۷- آن را به حرارت اتاق منتقل کرده و دو مرتبه با P.C.I استخراج کنید تا ژل از آن حذف شود

۸- استات سدیم (غلظت نهایی 0.3M) اضافه کرده با الکل رسوب دهید

درس ششم

کلونینگ (Cloning)

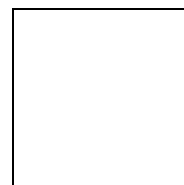
۱۷- اتصال دو DNA به یکدیگر در آزمایشگاه :

به رای اتصال دو DNA به یک دیگر در آزمایشگاه از آنزیم DNA ligase استفاده می‌شود. DNA ligase به یون دینوکلئوتید داتصال فسفودی استر ایجاد میکند. دینوکلئوتید DNA ligase و د دارد یک DNA ligase 4 که از فائز T4 است. تخراب میشود و انرژی لازم برای فعالیت خود را از ATP تامین میکند. این آنزیم دوانتهای blunt و همچنین دوانتهای Cohesive را بهم متصل کند (اتصال فسفودی استر ایجاد میکند). دیگر ری DNA ligase به باکتری E.coli که از رژی لازم به رای فعالیت خود دراز NAD استفاده می‌آورد و بیشتر برای اتصال انتهای Cohesive استفاده میشود.

عمل Ligation طی سه مرحله انجام میگیرد :

در مرحله اول گروه آدنیل از NAD (ATP) به آنزیم متصل میشود و زنجیره جانبی NH₂ به آمینیلزین آدنیل به میشد و دو پیروفسفات (P₄ آنزیم T4 DNA ligase) یا نیکو تینامید (با آنزیم E.coli DNA ligase) آزاد میشود.

در مرحله دوم گروه آدنیل به انتهای 5'-P متصل میشود. در مرحله سوم اتصال فسفودی استر به یون گرو هیدروکسید 3'-OH و گرو فسفوریل آدنیل به 5' برقرار میشود و AMP آزاد میگردد.



شکل ۵- طرز عمل DNA ligase این آنزیم نوکلئوتیدها را از انتهای 3'-OH و 5'-P بهم متصل میکند. آنزیم لیگاز توسط NAD (باکتری) یا ATP (فائز T4) آدنیله میشود. آنزیم انتهای 5'-P را در محل شکاف آدنیله میکند و اتصال فسفودی استر تولید میشود. (R پیوز و A آدنیلن)

انجام واکنش Ligation:

۱- مقدار insert و vector را تخمین بزنید (برای انجام واکنش مولاریته insert را سه برابر vector در نظر بگیرید)

۲- حجم واکنش را در نظر بگیرید (بهتر است يك ميكروگرم DNA را در واكنشي به حجم ۲۰-۳۰ ميكروليتر انجام گيرد)

۳- با آب دوبار تقطير استريل حجم واكنش را تنظيم كنيد

۴- واكنش را مدت ۵ دقيقه در ۴۵ درجه قرار دهيد تا انتهاهاي Cohesive كاملا "Relax" شوند

۵- بافر Ligation را با غلظت نهايي 1x استفاده كنيد

۶- يك ميكروليتر آنزيم T4 DNA ligase به واكنش اضافه كنيد

۷- چند ثانيه آن را spin كنيد

۸- مدت ۲-۳ ساعت در دماي ۳۷ درجه قرار دهيد و سپس واكنش را ترانسفرم كنيد.

۱۸- پيدا كردن كلني هاي حاوي Recombinant DNA:

در اين كارگاه آموزشي از دو روش استفاده ميكنيم

الف) غير فعال كردن ژن مقاومت به تتراسيكلين پلاسميد pBR322

جايج ماه آنزيم BamHI ويكائس ژن مقاومت به تتراسيكلين پلاسميد pBR322 را دارد چنانچه DNA جي در جايج ماه اين آنزيم كلون شود و پلاسميد نو تركيب در باكتري ترانسفرم گردد ، باكتري نسبت به تتراسيكلين حساس ميشود. Insert DNA- ورد اسد تفاده كه قطع ه اي از DNA ميتوكندري (kDNA) انگل ليشمانيا ميباشد در حدود 800bp است كه آن را در جايجاه BamHI پلاسميد pBR322 كلون ميكنيم

۱- محصول Ligation را در باكتري HB101 ترانسفرم كنيد (باكتري XL1-blue بيت به تتراسيكلين مقاوم است و ب راي اين ن آزم ايش قاب ل استفاده نميباشد).

۲- محصول ترانسفرم شده را روي پليت آگار حاوي آمپي سيلين و بدون تتراسيكلين پخش كنيد.

۳- روز بعد يك Master plate حاوي آمپي سيلين و بدون تتراسيكلين تهيه كنيد و آن را شطرنجي نموده و خانه هاي آن را شماره گذاري نماييد د سپس كلني هاي حاصل از ترانسفرماسيون شب قبل را داخل خانه هاي شطرنجي (شماره دار) پليت منتقل كنيد.

روز بعد نيز آگار پليت مشابه روز قبل تهيه كنيد كه داراي دو آنتي بيوتيك آمپي سي سيلين و تتراسيكلين باشد (100µg /ml آمپي سي سيلين و 12.5µg/ml تتراسيكلين) و هر كلني را در خانه هم شماره آن روي پليت حاوي تتراسيكلين و آمپي سيلين كشت دهيد

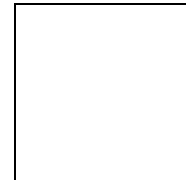
۵- روز بعد هر کدام از كلني ها كه رشد نكرده باشند حاكي از حساس بودن آنها به تتراسيكلين ميباشد (قطع ه DNA- ورد نظ رد ر پلاسميد كلون شده است).

۶- كلني باكتري كه رشد نكرده را از روي Master plate شماره ۱ (بدون تتراسيكلين) پيدا کرده و از آن كشت شبانه تهيه كنيد

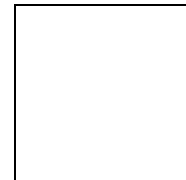
پلاسميد آن را استخراج کرده و با آنزيم BamHI آن را برش دهيد ، بعد از الكتروفرورز بايد قطعه DNA كلون شده را روي ژل مش اده كنيد د (تقريباً 800bp ميباشد) .

ب) غير فعال كردن ژن LacZ پلاسميد Bluescript و مشاهده كلني هاي آبي و سفيد

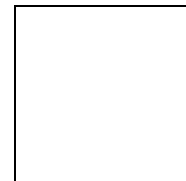
(α - complementation test) همانطور که قبلاً گفته شد MCS پلاسמיד Bluescript داخل ژن lacZ^- پیوسته شده است. بدین کانس این ژن قسمتی از کانس ژن آنزیم β -galactosidase است، این آنزیم اتصالات بتا گالاکتوزیدی لاکتوز را تجزیه کرده و لاکتوز را به گلوکز و گالاکتوز تبدیل میکند، همچنین ماده X-gal را که آنالوگ لاکتوز میباشد تجزیه کرده و رنگ آبی تولید میکند. بدین لولی (باکتری) که آنزیم بتا گالاکتوزیداز آن ناقص باشد یعنی ژن قطعه LacZ^- را نداشته باشد چنانچه با پلاسمیدی که کانس ژن LacZ^- داشته باشد ترانس فرم گردد آنزیم بتا گالاکتوزیداز آن کامل میشود و میتواند لاکتوز یا X-gal را تجزیه کند. چنانچه insert DNA در MCS پلاسמיד کلون شده و ژن مذکور غیر فعال شده و باکتری نمیتواند بعد ترانسفرم شدن با پلاسمید X-gal تجزیه کند در نتیجه رنگ آبی تولید نمیشود و کلونی های بیرنگ تولید میشود.



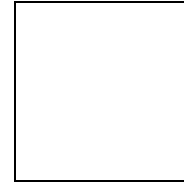
شکل شماره ۶: مراحل غربالگری کلنی های حاوی پلاسمید pBR322 نو ترکیب از طریق غیر فعال کردن ژن مقاومت به تتراسیکلین.



شکل شماره ۷- اپرون lac. ژنهای ساختمانی lacA, lacY, lacZ به ترتیب آنزیمهای ترانس استیلاز، لاکتوز پرمیاز و بتا گالاکتوزیداز را کد میکنند (Z,Y,A). این ژنها توسط پروموتور (P) و اپراتور (O) کنترل میشوند. اپراتور جایگاه اتصال پروتئین رپرسور است و ژن lac آن را کد میکند. ژن رپرسور توسط پروموتور (P) خودش کنترل میشود.



شکل شماره ۸: اختتام X-gal. اثر آنزیم β -galactosidase روی این. آن آنزیم X-gal را به لاکتوز و ۵-ایندوکسیل (indoxyl) تجزیه میکند، سپس ایندوکسیل اکسید شده و به دی برومو-کلرو تبدیل میشود که رنگ آن آبی میباشد.



شکل شماره ۹- روش غیر فعال کردن آنزیم بتا گالاکتوزیداز:

(A) در سید تم. α -complementation test. کروموزوم و زوم باکتری ژن lacZ ناقص دارد و قسمت N-ترمینال (α peptide) ژن- β galactosidase تکمیل نمیکند و محصول ژن فاقد داین قسمت میباید. ژن lacZ پلاسید مید در داخل باکتری قسمت α peptide را کد میکند و ژن بتا گالاکتوزیداز فائکشنال تولید میشود که در حضور X-gal رنگ کلنی های باکتری آبی میشود. (b) یک قطعه DNA در پلاسید مید کلون شده، ژن lacZ ناقص شده است و نمیتواند X-gal را تجزیه کند در نتیجه کلنی های باکتری سفید میگردند.

۱- DNA را در جایگاه آنزیم BamHI یا EcoRI پلاسمید Bluescript کلون (Ligate) کنید.

۲- واکنش ligation داخل باکتری XL1-blue انجام دهید. فرم کنید و ژن آنزیم β -galactosidase باکتری ناقص است و هم راه ژن lacZ پلاسمید Bluescript کامل میشود اما ژن آنزیم بتا گالاکتوزیداز باکتری HB101 کامل است و برای این منظور قابل استفاده نمیباید. ۳- باکتری ترانسفورمده را روی آگار پلیت حاوی X-gal و IPTG پخش کنید. (IPTG ماده القا کننده پروموتور ژن است و موجب بیان آنزیم β -galactosidase میشود).

قبل از پخش کردن واکنش روی پلیت به هرکدام ۰.۵ میلیلیتر از ۲۰ mM X-gal و ۰.۵ میلیلیتر از ۲۰۰ mg/ml IPTG اضافه کنید.

۵- روز بعد (۱۶-۱۲ ساعت) کلنی های آبی و سفید روی پلیت آگار رشد میکنند که کلنی های سفید حاوی Recombinant plasmid میباشند.

توجه: روی پلیت حاوی X-gal و IPTG چند ساعت بعد از درنگ آبی بخوبی ظاهر میشوند. کلنی حاوی ژن بتا گالاکتوزیداز آبی کم رنگ و محیط آن آبی پررنگ است. در مرکز کلنی های سفید نقطه آبی خیلی کم رنگ دیده میشود و ولی محیط آنها بزرگ است. کلنی های سفید را کشت دهید و پلاسید آنها را استخراج کنید. پلاسید را با آنزیم BamHI کنید. برای دیدن اینکه آیا کلنی ها DNA کلون شده را روی ژل مشاهده کنید.

درس هفتم

۱۹- Polymerase Chain Reaction (PCR)

واکنش زنجیره ای پلیمراز روشی است که قسمتی از سکانس مولکول DNA بین دو پرایمر قرار دارد توسط آنزیم پلیمراز و یکمک چه ار داکسی نوکلئوتید تری فسفات در آزمایشگاه تکثیر (Amplify) میشود. DNA شکل از دو رشته آنتی پارالل میباید که توسط اتصالات هیدروژنی و بصورت کووالاننت به یکدیگر متصل هستند.

همانند سازی DNA کمک الیگو نوکلئوتید هایی که پرایمر گفته میشود و اندام میگو رد الیگو نوکلئوتیدها مولکول های DNA که رشته کوتاه هستند که هر کدام از آنها مکمل یک انتهای سکانس DNA هدف (الگو) میباشند.

پرایمر ها توسط آنزیم DNA پلیمراز و در حضور dNTP ها از روی DNA الگو (تکه رشته ای است همانند سازی میکند و رشته ها ای جدیدی مکمل رشته های هدف سنتز میگردد.

مراحل يك سيكل PCR :

۱- مرحله Denaturation : در این مرحله DNA هدف بر اثر حرارت تکه رشته ای میشود.

۲- مرحله Annealing : در این مرحله با کاهش حرارت سیستم ، پرایمر ها در محل مناسب روی رشته مکمل متصل میشوند

۳- مرحله Extension : در این مرحله که دمایی آن برای آنزیم DNA پلیمراز مطلوب میباشد موجب توسعه پرایمر ها شده و همانند سازی DNA هدف انجام میگردد. محصول PCR عبارت است از قطعه همانند سازی شده ای که دو طرف این قطعه سکانس پرایمر ها وجود دارند .

فاکتور هایی که روی کار آبی PCR تاثیر دارند:

۱- بعد از ۲۵ تا ۳۰ سیکل بعثت حرارت آنزیم دناتوره شده و غیر فعال میشود

۲- غلظت زیاده رشته های هدف موجب Reannealing آنها شده و با پرایمر ها رقابت میکنند .

روش PCR توسط مولیس کارمند شرکت Cetus ابداع گردید. ابتدا این کار توسط سه بن ماری با حرارت های مختلف انجام میگرفت و از آنزیم کلنو بعنوان DNA polymerase استفاده میشد. این آنزیم در اثر حرارت دناتوره میشود اجباراً "باید دوباره در هر سیکل به واکنش اضافه شود. Saiki از آنزیم DNA polymerase مقاوم به حرارت که از باکتری ترموس آکواتیکوس خالص میشود و اصطلاحاً "Taq DNA polymerase گفته میشود استفاده کرد و امروزه واکنش PCR بصورت اتوماتیک انجام میگردد.

پارامتر های موثر در PCR :

۱- زمان و دمای Denaturation بستگی به تعداد G و C دارد

۲- دمای Annealing پرایمر ها که باید ۳-۴ درجه کمتر از دمای ذوب پرایمر ها باشد

۳- زمان Primer extension که به تعداد باز های بین دو پرایمر بستگی دارد

۴- تعداد سیکلها

۵- Ramp (زمانی که طول میکشد تا دمای مبدا دستگاه به دمای مقصد برسد) هرچه این زمان کمتر باشد نتیجه کار بهتر است و واکنش زمان کمتری در دمای ناخواسته قرار نمیگیرد

۶- غلظت dNTP ها و یون منیزیم (بنا بر مجموعه ای را تشکیل میدهند که موجب فعالیت آنزیم پلیمراز میشوند و غلظت این دو ماده تابعی از یکدیگر میباشد)

۷- غلظت Template DNA (يك دهم تا يك ميكروگرم میباشد) چنانچه DNA هدف بصورت مالتی کپی در ژنوم باشد بهتر است.

۸- اضافه کردن تشدید کننده های PCR

۱۰- حذف مهارکننده های آنزیم از محیط

۱۱- بهتر نقطه ذوب پرایمر ها (شبیه هم باشد) (Tm یکسان داشته باشند).

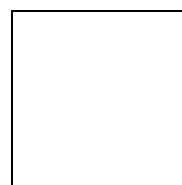
۲۰- طراحی پرایمر :

پرایمر های PCR بصورت کاملاً اختصاصی و مکمل ناحیه مورد نظر DNA هدف طراحی میگردند. پرایمر ها ۲۰-۳۰ باز دارند و پرایمر های بیش از ۳۰ باز اختصاصیت خوبی ندارند. همچنین پرایمر باید دمایی آنیلینگ بالا داشته باشد بهیچ وجه ر است تع داد باز های دو پرایمر مساوی باشند و از پلی پورین یا پلی پیریمیدین نباشند، همچنین نواحی تکرار شونده نداشته باشند چنانچه باز های G یا C درصد ورت تک راری و پشت سر هم باشند پرایمر بصورت لوپ در می آید و عملاً "سیستم کار نمیکند". انتهای ۳' دو پرایمر نباید مکمل باشد زیرا پرایمر را دایمر تشکیل میشود.

نرم افزارهایی وجود دارد که طراحی پرایمر را انجام میدهند بعد از طراحی پرایمر بهتر است توسط **آنالیز** آنها را چک نمود تا مشخص شود که با چه ژنهایی دیگر میتوانند **Anneal** گردند.



ب



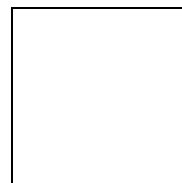
الف

شکل شماره ۱۰- شمای PCR

• در هر سیکل PCR تعداد مولکولهای DNA دو برابر میشود. رشته های DNA توسط حرارت (۹۳-۹۵ درجه) از یکدیگر باز میشوند (Denaturing) و سپس در دوره بعد که حرارت پایین می آید (۵۰-۶۰ درجه) پرایمر ها بصورت اختصاصی به ناحیه هدف متصل میشوند (Annealing). آنزیم Taq DNA polymerase در دمای مطلوب (۷۲ درجه) و در دافر مخصص و ص, چه ار, dATP, dTTP, dCTP, dGTP را طبق رشته الگو بهم متصل میکند (Extension).

در هر سیکل PCR تعداد مولکولهای DNA دو برابر میشود. رشته های DNA توسط حرارت (۹۳-۹۵ درجه) از یکدیگر باز میشوند (Denaturing) و سپس در دوره بعد که حرارت پایین می آید (۵۰-۶۰ درجه) پرایمر ها بصورت اختصاصی به ناحیه هدف متصل میشوند (Annealing). آنزیم Taq DNA polymerase در دمای مطلوب (۷۲ درجه) و در دافر مخصص و ص, چه ار, dATP, dTTP, dCTP, dGTP را طبق رشته الگو بهم متصل میکند (Extension).

لازم به ذکر است که DNA های کوتاه (Short target product) رشته هایی که بین دو پرایمر محصور هستند تصادفی و نمایی (exponential) و DNA های بلند (long target product) یعنی رشته هایی که از یک طرف توسط یک پرایمر محدود هستند و از سمت دیگر نامحدود میباشند بصورت تصاعد حسابی (linearly) زیاد میشوند.



تصویر بزرگتر

شکل شماره ۱۱- نحوه تکثیر DNA به روش PCR

شکل شماره ۱۲ - نحوه تشکیل پرایمر دایمر . چنانچه انتهاهاي 3'-OH پرایمر چند باز مکمل داشته باشد نباید یک دیگر Anneal شده و هر کدام برای دیگری بجای پرایمر عمل کرده و پرایمر دیگر را الگو قرار داده و Amplification انجام میشود.

مواقعی که پرایمر ها کاملاً " مکمل DNA هدف (الگو) نباشند :

- ۱- پرایمر هایی که برای ایجاد موتاسیون در یک ژن طراحی میگردند
 - ۲- پرایمر هایی که سمت 5' آنها جایگاه شناسایی آنزیم محدودگر تعبیه میشود تا بتوان محصول PCR را توسط آن آنزیم به روش داد این کار برای کلون کردن محصول PCR انجام میشود.
 - ۳- پرایمر هایی که لازم است محصول PCR آنها دارای پروموتور باشد و برای بیان یک ژن کاربرد دارند
- فاصله دو پرایمر باید کمتر از 10 kb باشد (کارایی همانند سازی برای محصول PCR بیش از 3kb کمتر است) بهتر است پرایمر ها را بر حسب کاری که لازم داریم طراحی شوند

چگونگی رد یابی (detect) محصول PCR :

- ۱- هیبرید شدن محصول PCR با الگو نوکلئوتید نشاندار (پروب) ۳- الکتروفورز روی ژل آگارز یا پلی اکرلامید
- انواع PCR (بمنظور تصحیح محصول):
- ۱- Hot start PCR: ازت است از جدا کردن یک یا چند ترکیب مهم PCR (ترجیداً آنزیم پلیمراز یا پلافاست) به بعد از دناتوراسیون DNA هدف به واکنش اضافه میشوند (استفاده از PCR gem , و آنتی بادی آنزیم پلیمراز)
 - Hot start بکمک آنتی بادی مونوکلونال آنتی بادی ضد آنزیم پلیمراز را به واکنش اضافه میکنند در نتیجه فعالیت پلیمرازی آنزیم را مهار میکنند. هنگامیکه دمای واکنش به ۹۴ درجه میرسد آنتی بادی دناتوره میشود و دوباره پلیمراز فعال میشود.
 - Hot start بکمک Ampliwax دیواره لوله های مخصوص اینکار به نوعی واکنش اضافه میکنند در نتیجه فعالیت پلیمرازی آنزیم را مهار میکنند و روی واکنش را میپوشانند آنزیم پلیمراز را روی واکنش قرار میدهند. در دمای ۹۴ این واکنش رخ می دهد و آنزیم پلیمراز با واکنش تماس پیدا میکند
- ۲- Touch down PCR : در این روش دمای آنیلینگ از دمای بالاتر از Tm بندرت کاهش میابد و موجب کاهش محصول کاذب و پرایمر دایمر میشود.
 - ۳- Nested PCR: واقعی کف DNA هم وارد آزمایش کم باشد در این روش وگیری از بوالا بردن مقدار DNA مهم را واکنش توسط پرایمر های خارجی قطعه طولیتری همانند سازی میشود و از محصول PCR اول که بیشتر DNA هدف همانند سازی شده است یک واکنش دیگر با پرایمر های داخلی انجام میگردد. در این روش اختصاصیت و حساسیت PCR بالا میرود.

۵- Long distance PCR : با این روش قطعات بزرگتر از 20 kb همانند سازی میشوند. برای انجام این نوع PCR باید DNA ژنومی از کیفیت بالایی برخوردار باشد دو پرایمرها به دقت طراحی شوند و در این تکنیک از Taq polymerase استفاده میشود و این آنزیم نسبت به حذف شدن از DNA است که قسمت N ترمینال آن حذف شده است و با Taq polymerase به نسبت ۱۸۰ به ۱ مخلوط میشود و فاقد 5' آگرو نوکلئاز است

کلونینگ با PCR :

۱- قرار دادن جایگاه شناسایی آنزیمهای برش دهنده در طرف 5' سکانس پرایمر.

مشکلات : این جایگاه ممکن است روی قطعه همانند سازی شده نیز وجود داشته باشد.

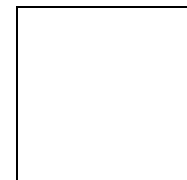
گاهی این جایگاه هنگام هضم شدن با آنزیم اشکال ایجاد میکند که باید تعدادی باز به انتهای 5' پرایمر اضافه شود.

استفاده از جایگاه دو آنزیم متفاوت در هضم اشکال ایجاد میکند.

۲- Blunt end ligation : برای اینکار دو انتهای قطعه همانند سازی شده باید Polish شود این کار توسط آنزیمهای Klenow و T4 DNA polymerase (پرکردن قسمت overhang) و یا آنزیمهای S1 nuclease و Mong bean nuclease انجام میشود

۳- T vector - پلاسمید ناقل را با آنزیم EcoRV یا هر آنزیم دیگر که DNA را بصورت blunt میبرد هضم میکنند و سپس توسط آنزیم Terminal transferase یا آنزیم Taq polymerase تعادلی ایجاد میکنند و انتهای 3' آنزیمها را با پلاسمید خطی شده اضافه میکنند. (لازم به ذکر است که آنزیم Taq polymerase دارای خاصیت ترمینال ترانسفرازی است و تعدادی A به انتهای 3' محصول آمپلی فای شده اضافه میکند). با انجام واکنش Ligation پلاسمید و محصول PCR را بهم متصل میکنند.

۴- تولید نیمه جایگاه شناسایی یک آنزیم برش دهنده در طرف 5' پرایمر. قطعات با T4 polynucleotide kinase و ATP فسفریله میشوند و سپس بهم متصل میگردند، بعد توسط یک آنزیم هضم شده و کلونینگ انجام میگردد.



شکل شماره ۱۳ کلون کردن محصول PCR به روش T-A cloning : پلاسمید با یک آنزیم که DNA را بصورت blunt قطع میکند هضم میشود و سپس توسط آنزیم ترمینال ترانسفراز یا Taq polymerase و dNTP تعادلی ایجاد میکنند و انتهای 3' آن اضافه میکنند و واکنش Ligation از این وکتور با محصول PCR که در انتهای 3'-OH آن باز A دارد انجام میگیرد و پلاسمید در یک باکتری ترانسفرم میشود.

ایجاد تغییر در محصول PCR :

میتوان در سمت پایه 5' پرایمر یک پروموتور و یا جایگاه اتصال ریبوسوم (Ribosome Binding Site) تعبیه نمود، همچنین میتوان یک Non translated leader بین پروموتور و ژن قرار داد تا ناحیه برای شروع سنتز پروتئین مناسب باشد این کار بر بدنه Expression PCR گفته میشود

۲۰- Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR) :

تعدادی از آنزیم های پلیمراز بجای DNA از RNA بعنوان سوپسترا استفاده میکنند و از روی RNA يك رشد ته DNA- ننز میکنند د. رشد ته جدید سنتز شده را cDNA میگویند و واکنش بنام **نسخه برداري معكوس** (Reverse transcription) گفته میشود. آنزیمهایی که از RNA بعنوان سوپسترا استفاده میکنند Reverse trnsriptase معروف هستند.

آنزیم Tth که از باکتری ترموس ترموفیلوس بدست می آید در حضور یون منگنز فعالیت Reverse trnsriptase و در حذر وریون منیزیم و فعالیت DNA polymerase دارد. آنزیم AMV يك رشد وریوس پرند دگان بنام Avian Myeloblastosis Virus trnsriptase استخراج میگردد فعالیت RNase H هم دارد. دمای مطلوب فعالیت آن ۲۵ درجه است و برای تهیه cDNA با طول کمتر از 500 b استفاده میگردد. آنزیم MMLV از يك نوع وریوس جوندگان بنام Mouse Molony Leukemia Virus استخراج میشود و فعالیت RNase H آن کمتر از آنزیم قبلی میباشد. در ۳۷ درجه فعالیت میکند. آنزیم Superscript آنزیم MMLV-هندسی شده است که ژن قسمتی که فعالیت RNase H دارد را از آن حذف کرده اند و برای تهیه cDNA بزرگ استفاده میگردد.

PCR با پرایمر های احتمالي (Degeneracy primer):

این پرایمر ها بر اساس اطلاعات ترادف پروتئین يك ژن طراحی میشوند و بر اساس اسید های آمینه ای انجام میگردد که دارای يك یا دو کدون باشند.

پرایمر های RAPD - بنام پرایمر های اختیاری هم گفته میشوند. این پرایمر ها پلی مرفیسم را بدون شناخت توالی نوکلئوتیدی ردیابی میکنند

۲۱- استخراج DNA از خون :

۱- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر خون (خون لخته نشده باشد - برای کار های PCR از EDTA بعنوان ضد انعقاد استفاده شود زیرا مواد ضد انعقاد دیگر مهار کننده آنزیم پلیمراز میباشد)

۲- مقدار يك سي سي از باهر لیز کننده به آن اضافه کرده سانتریفیوژ نمایید

Lysis buffer = 0.33 M sucrose, 10mM Tris , 5mM MgCl2, 1% Triton X-100

۳- مایع رویی را دور بریزید و رسوب حاصل را چندین مرتبه در بافر فوق سوسپانسیون نموده سانتریفیوژ کنید تا رسوب بستر آمده شقیف گردد.

۴- مقدار ۴۰۰ میکرولیتر بافر لیز کننده به آن اضافه نموده سوسپانسیون کنید و مدت ۲۰ دقیقه بجوشانید.

۵- با فنل و کلر فرم آن را استخراج کنید

۶- با الکل آنرا روب داده و در ۵۰ میکرولیتر آب حل کنید

۷- مقدار ۵۰۲ میکرولیتر آن را برای واکنش PCR استفاده کنید.

۲۲- انجام واکنش PCR

توجه: آزمایش باید در محلی بدون رفت و آمد انجام گیرد. سمپلر های مورد استفاده نباید برای کار های دیگر استفاده شوند، ظروف، لوله ها و سر سمپلر ها اتو شونند و هنگام کار از دستکش استفاده شود.

انجام واکنش PCR: مواد زیر را داخل لوله مخصوص واکنش PCR بریزید:

10mM dNTP

0.5 µl (0.1mM)

| | |
|--------------------|-------------------|
| 10x PCR buffer | 5 µl |
| MgCl ₂ | 1.5 µl (1.5 mM) |
| Primer -1 | 20pmmol |
| Primer -2 | 20 pmol |
| Taq DNA polymerase | 0.25 µl (1.25 U) |
| Template DNA | 0.1- 1 µg |
| dH ₂ O | up to 50µl |

لوله ها را داخل **Block** دستگاه ترموسایکلر قرار دهید و دستگاه را روشن کنید. هفت دار 100 µl روغن معدنی روی واکنش بریزید تا از بخار شدن مواد ممانعت بعمل آورد. لازم به ذکر است که دستگاههای ترموسایکلر جدید بصورت **Heated lid** ساخته شده اند یعنی درب دستگاه که روی لوله های واکنش قرار میگیرد حدود ۱۰۵ درجه گرم میشود در نتیجه بالای لوله گرمتر از پایین آن است و از بخار شدن مواد داخل لوله جلوگیری میشود). پس از اتمام کار محصول آمپلی فای شده را با آگارز ۳ درصد الکتروفورز کنید.

۲۳- استخراج RNA از سرم:

از دستکش یکبار مصرف استفاده کنید. تیپ و لوله های مورد استفاده را اتوکلاو شوند. در محیط کار و دستها **RNase** زیاد است و RNA زود هیدرولیز میشود

لوله , تیپ و مواد و لوازمی که با RNA در تماس هستند نباید با دست بدون دستکش تماس پیدا کنند.

۱- مقدار ۵۰۰ میکرولیتر از بافر **RNX^{plus}** در لوله ۱/۵ سی سی بریزید

۲- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از سرم به آن اضافه کنید و درب لوله را بسته خوب مخلوط کنید

۳- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر کلرفرم به آن اضافه کنید

۴- درب لوله را بسته و خوب بهم بزنید و ۲ دقیقه در هوای آزاد قرار دهید

۵- مدت ۱۰ دقیقه با ۱۰ هزار دور در دقیقه سانتریفیوژ کنید

۶- مایع شفاف رویی را به لوله جدید منتقل کنید.

۷- دوبرابر حجم آن الکل مطلق اضافه کرده و ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ کرده مایع رویی را حذف کنید و لوله را وارونه روی کاغذ جذب الرطوبه قرار دهید

۸- مقدار ۱۰۰ میکرولیتر الکل ۷۵ درجه اضافه کرده سانتریفیوژ کنید و سپس مایع رویی را حذف کرده و رسوب را خشک کنید

۹- رسوب را در ۴۰ میکرولیتر **DEPC treated water** حل کنید

۲۴- انجام RT-PCR:

۱- مقدار ۱۰ میکرولیتر از RNA مرحله قبل را RT-PCR استفاده کنید

| | |
|--------------|-------------|
| RNA | 10 µl |
| RT buffer | 4 µl |
| RT enzyme | 0.5 µl |
| RNasine | 0.3 µl |
| dNTP | 1 µl |
| primer (1&2) | 20pmol |
| DEPC water | up to 20 µl |

قبل از اضافه کردن RNA مدت ۱۰ دقیقه آن را در ۷۰ درجه قرار دهید تا از تشکیل ل و پ ج و گیری شود. واکنش را یک ساعت در ۴۲ درجه قرار دهید و سپس ۵ دقیقه در ۹۴ قرار دهید تا RT غیر فعال شود و آنزیم پلیمراز را مهار نکند. سپس به هر لوله مقدار 0.25 µl آنزیم پلیمراز اضافه کنید و با برنامه زیر واکنش را ۳۰ سیکل ادامه دهید:

| | | |
|--------------|-----|--------|
| Denaturation | 94° | 30 sec |
| Annealing | 55° | 30 sec |
| Extension | 72° | 30 sec |

برای واکنش Nested مقدار یک میکرولیتر از محصول PCR استفاده کنید

| | |
|-----------------|---------|
| Taq poly | 0.25 µl |
| 10 x PCR buffer | 5 µl |
| Mg Cl2 | 1.5 µl |
| Primer (F&R) | 3 µl |

| | |
|------|-------------|
| DNA | 1 µl |
| dH2O | up to 50 µl |

واکنش را مختصری سائتریفیوژ کنید و با برنامه زیر واکنش را ۳۰ سیکل ادامه دهید:

| | | |
|--------------|-----|--------|
| Denaturation | 94° | 30 sec |
| Annealing | 57° | 30 sec |
| Extension | 72° | 30 sec |

در انتها مدت ۵ دقیقه آن را در دمای ۷۲ درجه قرار دهید

واکنش را با ژل آگارز ۳ درصد الکتروفورز کنید (پرایمرها تعداد 250bp را از ناحیه 5' UTR ویروس هپاتیت C را آمپلی فای میکنند).

باید ها و نباید ها در PCR

۱. هنگام تهیه واکنش نمونه کنترل مثبت را آخر کار تهیه کنید
۲. اعمال قبل و بعد از PCR جدا از همدیگر انجام گیرند
۳. برای استفاده از هر ماده از پیپت جدا گانه و اختصاصی استفاده کنید
۴. از پیپت هایی که دارای plug هستند و یا از پیپت های یکبار مصرف استفاده کنید
۵. مواد ذخیره آزمایشگاه را تقسیم کرده و فریز کنید و هر چند وقت صحت آنها را کنترل کنید
۶. هنگام استفاده هر لوله را spin کنید تا موادی که به اطراف درب لوله چسبیده اند رسوب کنند
۷. چندین کنترل منفی حین آزمایش Run کنید
۸. برای انجام آزمایشهای تاییدی از موافریز شده استفاده کنید
۹. همیشه DNA آمپلی فای شده را خارج از محل آماده کردن نمونه نگهداری کنید
۱۰. هنگام کار با PCR product مقداری از آن را جدا گانه نگهدارید

۲۵- آنزیمها ی مورد استفاده در مهندسی ژنتیک

آنزیم ها ابزار کار مهندسی ژنتیک در آزمایشگاه میباشند و محقق بدون آنها نمیتواند کاری انجام دهد. در این درس با انواع آنزیمها و طرز کار آنها آشنا شده و مورد استفاده هر کدام را بررسی میکنیم.

الف (لیگازها :

این آنزیمها اتصال فسفو دی استر بین تک رشته ها را روی رشته DNA تک رشته ای برقرار میکند. $5'-p$ یک رشته به $3'-OH$ رشته دیگر متصل میشود. کو فاکتور آنها ATP یا NAD است.

۱- آنزیم DNA ligase این آنزیم از ب اکتري E.coli اسرلخ می شد و د و کوف اکتور آن NAD است و اکت را اتصال بین دو DNA که وش انتھ ایی انھ ابصد ورت Cohesive بلئر میکند دو ع ده ای معتقدند که ای ن آنزیم در فرقه راک ردن اتصال بین دو DNA که برش انتھایی آنها بصورت blunt باشد مشکل خواهد داشت.

۲- آنزیم DNA ligase T4: این آنزیم از ف اژ T4 تخرار می شد و د و کوف اکتور آن ATP است تا ی ن آنزیم ال ه ردوانته ای Cohesive و blunt را برقرار میکند.

۳- آنزیم T4 RNA ligase: این آنزیم اتصال فسفو دی استر بین $5'-P$ مولکولهای RNA را بر فرقه راک میکند. کو فاکتور آن ATP و Mg^{2+} است

ب) نوکلئازها :

این آنزیم ها نوکلئوتیدها را تجزیه میکنند.

۴- آنزیم DNase I: یک اندو نوکلئاز است و DNA را به روش غیر اختصاصی تجزیه میکند. کو فاکتور آن Ca^{2+} ، Mg^{2+} و Mn^{2+} است. این آنزیم برای مقاصد زیر استفاده میشود:

- تجزیه غیر اختصاصی DNA

- نشاندار کردن DNA

- ایجاد موتاسیون در ژن

۵- نوکلئاز استا فیلوکوکي: DNA و RNA را به روش غیر اختصاصی تجزیه میکند.

۶- آنزیم RNase A- این آنزیم RNA تکه رشته‌ای را هیدرولیز می‌کند.

۷- آنزیم RNase H- این آنزیم RNA را که با DNA دابلکس شده باشد راهیدرولیز می‌کند و در سنتز رشته دوم cDNA کاربرد دارد.

۸- آنزیم S1 Nuclease : این آنزیم پلی نوکلئو تید تکه رشته‌ای را هیدرولیز می‌کند.

۹- آنزیم Mong bean Nuclease – این آنزیم شبیه S1 Nuclease عمل می‌کند

۱۰- آنزیم Exonuclease III (گرو نوکلئاز 5 → 3') : فعالیت 3' فسفاتاز دارد

همچنین فعالیت شبیه RNase H هم دارد.

این آنزیم اتصال فسفودی استرجایگاه‌های آپورینی یا آپیریمیدینی را تجزیه می‌کند

۱۱- آنزیم Bal1 Nuclease : این آنزیم ssDNA را به روش آگرو نوکلئازی یا اندو نوکلئازی تجزیه می‌کند

ج) آنزیم های محدود گر

د) متیلازها

۱۲- فسفاتازها : این آنزیمها فسفومونواستراز غیر اختصاصی هستند که در pH پایایی فعالیت می‌کنند و درحض و پذیرنده ه اچید فات مانند د اتانل آمین و Tris بعنوان فسفو ترانسفراز عمل می‌کنند .

فسفاتاز اتصال P--O را تجزیه می‌کند ولی فسفوریلاز اتصال C--O را تجزیه می‌کند

کاربرد فسفاتاز ها :

دفسفریلاسیون انتهای فسفات اسید نوکلئیک

وقتی با پروتئین با اسید نوکلئیک کنژوگه شوند بعنوان آنزیم رپورتر عمل می‌کند

بعنوان leader در ترشح خارج سلولی و پروتئین های فیوژن عمل می‌کند

۱۳- آنزیمهای T4 poly Nucleotid Kinase : این آنزیمها فسفات γ را از NTP به مولکول پذیرنده (Aceptor) انتقال می‌دهد و عبارتند از:

پروتئین کیناز ها

کربو هیدرات کیناز ها

پلی نوکلئو تید کیناز ها

آنزیم T4 poly nucleotide kinase ای فسفریله کردن یا نشاندادن کردن OH استفاده می‌شود ، همچنین برای اندازه گیری فعالیت اندونوکلئازی بکار می‌رود.

• DNA پليمرازه گروه ي از آنزيمها هسند كه بكم لك چه ارنوكلوتيد دتري فسفات (dNTP) وي رشد ته الگ ويد ك رشد ته DNA سنتر ميكنن آنزيمها براي فعاليت خود احتياج به پرايمر دارند چنانچه داراي فعاليت 5'→3' اگرونوكلئازي باشد نوك ارنوكلوتيد غلط گيري (proof reading) را هم انجام ميدهند

۱۴- آنزيم DNA polymerase :

اين آنزيم داراي فعاليت هاي زير است :

فعاليت 5'→3' اگرونوكلئازي

فعاليت 3'→5' DNA پليمرازي

فعاليت RNase H

فعاليت نوكلئازي

اين آنزيم براي كارهاي زير استفاده ميشود :

DNA Labeling Nick translation

ايجاد انتهاهاي Blunt

۱۵- آنزيم T4 DNA polymerase : يك آنزيم مولتي فانكشنال است و براي كارهاي زير استفاده ميشود.

داراي فعاليت DNA پليمرازل

فعاليت 5'→3' اگرونوكلئازي

براي PCR هم قابل استفاده است و در ۳۷ درجه فعاليت ميكند

براي ايجاد انتهاهاي Blunt در dsDNA استفاده ميشود

فعاليت 5' نوكلئازي ندارد

۱۶- آنزيم T7 DNA polymerase : اين آنزيم داراي فعاليت 5'→3' اگرونوكلئازي ميباشد

Sequense نسخه اي از اين آنزيم است كه فاقد فعاليت 5'→3' اگرونوكلئازي ميباشد و براي Sequencing استفاده ميشود

سرعت پليمريزاسيون اين آنزيم زياد است و براي سنتر رشته موتازن در موتازنيزيس بكار ميرود

انتهاي 5' overhang را پر ميكند

۱۷- آنزيم Taq DNA polymerase : اين آنزيم از باكتري گرمادوست ترموس اكواتيکوس استخراج ميشود

فعاليت 5→3 اگرونوكلئازي ندارد

فعاليت 5' نوكلئازي دارد

فعالیت ترمینال ترانسفرازی دارد

آنزیمه های **خه ب ردار معکوس** () گروهی از DNA polymerase ها به نام RNA - dependent DNA polymerase^۱ Reverse Transcriptase گفته میشوند این آنزیمها RNA را الگو قرار داده و DNA مکمل آن را سنتز میکند و عبارتند از:

۱۸ - آنزیم AMV (Avian Myeloblastosis Virus) : این آنزیم از نوعی ویروس استخراج میشود که در پرندگان بیماری ایجاد میکند .

این آنزیم فعالیت RNase H هم دارد و برای سنتز رشته دوم cDNA استفاده میشود

۱۹ - آنزیم MLMV (Molony Murine Leukemia Virus) : این آنزیم از نوعی ویروس استخراج میشود که در جوندگان بیماری ایجاد میکند.

این آنزیم فعالیت RNase H کمتری از آنزیم AMV دارد .

۲۰ - آنزیم ترمینال ترانسفراز :

این آنزیم پلیمریزاسیون dNTP ها را از روی پایه 3' - OH انجام میدهد این آنزیم برای اتصال نوکلئوتید ها به انتهای 3' - OH رشته DNA استفاده میشود و برای کلونینگ محصول PCR قابل استفاده است.

۲۱ - آنزیم های RNA polymerase :

این آنزیم ها اطلاعات ژنتیکی را از DNA به RNA منتقل میکنند عبارتند از

RNA پلیمراز باکتریایی

T7 RNA پلیمراز ، یک پروموتور قوی دارد

T3 RNA پلیمراز

SP6 RNA پلیمراز

۲۲ - آنزیم پلیمراز A :

این آنزیم دم پلی A را سنتز میکند و در انتهای 3' رشته mRNA سلولهای یوکاریوت غیر هیستونی یافت میشود.

این آنزیم میتواند RNA های polyA منفی را به polyA⁺ تبدیل کند و آنها را بکمک (oligo) dT بعنوان پرایمر ، به cDNA تبدیل نماید

۲۳ - آنزیم های رپورتر / مارکر:

این آنزیمها در کلونینگ استفاده میشوند و چون سه بیگانه میشوند به رای غربالگری کلنی های باکتریایی مفید میباشد (آنزیم با گالاکتوزید از برای غربالگری توضیح داده میشود)

β گالاکتوزیداز - اتصالات گالاکتوزیدی را در الیگو ساکارید ها هیدرولیز میکند

β لاکتاماز - اتصالات آمیدی را در حلقه β لاکتام هیدرولیز میکند و پنی سیلینونیک اسید و سفالوسپورونیک اسید تولید میکنند که از نظر بیولوژیکی غیر فعال هستند

-کلرامفیکل استیل ترانسفراز (CAT) - کلرامفیکل را غیر فعال میکند

-لوسیفراز ها - آنزیم های تولید کننده نور هستند.

آنزیم های (برش دهنده) محدود گر (Restriction Enzymes)

اندو نوکلئاز های محدود کننده گروهی از **DNase** میباشد که توالی نوکلئوتیدی خاصی را شناسایی میکنند و آن را از **dsDNA** جدا میکنند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند.

سیستم های **R-M** که در میکرو ارگانیسمها (باکتریها) یافت میشوند بسیار گوناگون میباشد. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند.

سیستم های **R-M** دو فعالیت آنزیمی دارند:

الف) یک اندونوکلئاز (**R.ENase**) با جایگاه اختصاصی که مسئول هضم DNA خارجی میباشد

ب) یک متیلاز تغییر دهنده DNA (متیل ترانسفراز) که همان توالی ویژه را شناسایی میکند. متیل ترانسفراز (**M.MTase**) مسئول تغییر دادن و حفظ DNA خودی از هضم شدن توسط **R.ENase** میباشد. ممکن است فعالیت **R** و **M** یک آنزیم واحد (واحد) یا دو آنزیم جداگانه (واحد) باشد. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند.

انواع سیستم های آنزیمی Restriction - Modification

بر اساس ترکیب آنزیم، کوفاکتورهای مورد نیاز، قرینگی توالی DNA ای که شناسایی میکنند و مشخصات هضم DNA چه اندازه وسیع تقسیم میشوند. لازم به ذکر است که گروه متیل دهنده سوبسترا در تمام متیل ترانسفرازها **AdoMet** میباشد.

آنزیم های R-M نوع I:

مجموعه چند آنزیمی متشکل از زیر واحد های غیر همسان **R** و **M** میباشد. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند. این آنزیم ها در ابتدا برای برش دادن DNA در آزمایشگاه های تحقیقاتی استفاده می شدند.

آنزیم های R-m نوع II:

این آنزیمها دارای فعالیت R.ENase و M.MTase جداگانه میباشند. R.ENase دایمر بوده و زیر واحد های آنها همسان است در صورتیکه M.MTase ها آنزیم های مونومر میباشند. R.ENase های نوع II برای فعالیت خود فقط Mg^{2+} نیاز دارند.

R.ENase ها و M.MTase ها توالیه ایختصاصی نوکلئوتیدی مشابه را شناسایی میکنند. اکثر R.ENase های نوع دوم DNA را از محل جایگاه شناسایی برش میدهند ولی تعداد کمی از آنها که نوع IIS گفته میشوند DNA را در فاصله معینی از جایگاه شناسایی برش میدهند.

آنزیم های R-M نوع III:

این آنزیم ها متشکل از دو زیر واحد غیر همسان میباشند که برای فعالیت رستریکتیون به ATP و Mg^{2+} نیاز دارند. این آنزیم ها توالیه های کوتاه غیر پالیندرم را شناسایی کرده و DNA را از محل های معدود و رتیکه درجایگاه شناسایی تغییر می دهد (برش میدهند) این آنزیم ها را ATP-درولیز نمیکند و در برش دادن DNA به AdoMet (S-adenosylmethionine) نیاز ندارند. AdoMet موجب تحریک فعالیت اندو نوکلئازی آنها میشود.

آنزیم های نوع IV :

این آنزیمها از نظر تکاملی بین آنزیم های نوع II و III میباشند. این آنزیمها (مانند Eco571) متشکل از R.ENase و M.MTase جداگانه میباشند اما R.ENase که یک آنزیم مونومر میباشد فعالیت متیلاز هم دارد این فعالیت متیلازی قدرت کافی ندارد تا DNA میزبان را در vivo محافظت کند. R.ENase و M.MTase توالی های ناقرینه را شناسایی میکنند. R.ENase در حضور Mg^{2+} در فاصله معینی از جایگاه شناسایی DNA هدف را برش میدهد (مثلا "Eco571 با فاصله ۱۶/۱۴ نوکلئوتید از محل شناسایی این کار را انجام میدهد). فعالیت Restriction آنها توسط AdoMet تحریک میشود.

سیستم های Restriction یا Modification مستقل

علاوه بر چهار سیستم آنزیمی که بحث شد، بعضی از باکتریها سیستم های دیگری مانند سیستم R مستقل از M و سیستم M مستقل از R دارند. یک مقوله ای از سیستم تم های R-M، مقوله وژی و ترکیب اهمیت بخصوصی دارد Restriction به سه به Methylation MDRS () میباشد که R.ENase ترجیحا DNA در جایگاه های متیله برش میدهد. MDRS متشکل از فرآورده های ژنی است که به چندین جایگاه مستقل در ژنوم E.coli K12 مانند mcrA, mcrB و mrr متصل میباشند.

جدول شماره ۵- طبقه بندی سیستم های R-M

| Feature | نوع I | نوع II | نوع III | نوع IV |
|-----------------|-----------------------------|---|-------------------------|--------------------------|
| ساختار فعال R-M | زیم با سه زیر واحد (R.M.S) | پروتو تایپ نوع IIS آنزیم های جداگانه R دایمر R مونومر M مونومر | یک آنزیم با دوازیر واحد | زیم های مونومری جداگانه |
| کوفاکتورها | ATP و Mg^{2+} | Mg^{2+} | ATP و Mg^{2+} | mg (AdoMet) Mg^{2+} |
| جایگاه شناسایی | غیر قرینه | پالیندرم غیر قرینه | غیر قرینه | غیر قرینه |
| هضم DNA | فاصله متغیر از هر طرف | همان جایگاه به فاصله معینی از طرف 3' | 27bp تا 25bp ر ف | 14bp تا 3bp از طرف 3' |
| متیلاسیون و رشد | ته را بوسه M متیله میکند | دور شده یک متیل ترانسفراز روی هر رشته | فقط یک رشته | دو رشته |

سیستم های آنزیمی R-M نوع II:

آنزیم های محدودکننده ، مخصوصاً" نوع II توالی نوکلئو تیدی منحصر بفرد را شناسایی میکنند. دقت در انتخاب توالی نوکلئو تیدی خاص ، تنوع و ویژگیهای شناسایی و آمسانی نسبت به یکدیگر در **Restriction** اساس تفاده از **M.MTase** زمینه ای نو و علاقه و سه ایله ضد روری برای دستکاری **DNA** نموده است. بعلاوه توسعه **DNA** نو ترکیب نتیجه کشف آنزیم های با جایگاه اختصاصی میباشد.

تاکنون ژن محدود سیستم R-M کلون شده و تعیین مشخصات شده اند. ژن سیمپ تم های R-M از نظر سازمان، Orientation و اندازه هتروژن کلونیزه شده های آنها از الصب سازی از زیر راس انترک رده و از زیر ماکس وین الاثر تهیه می کنند و این را با این باقیمت کمتر برای استفاده وسیع تر در دسترس قرار دارند این کشف موجب شد تا جزئیات مکانیسم واکنش و برخورد DNA-protein در سطح مولکولی مطالعه شود. اغلب R. ENase ها بصورت تجارتي در دسترس قرار دارند و برای ایجاد قطعات DNA برای کلون کردن ژن، تعیین نقشه DNA و کروموزوم، DNA Sequencing و هیبریداسیون بطور گسترده استفاده میشوند.

نامگذاری آنزیمهای R-M

۱- سه حرف اول (ایبتالیک) جنس (اولین حرف جنس باکتری) و گونه (دومین و سومین حرف ارگانیزم منبع را به این می کند . مثلند Eco برای E.coli و Hin برای هموفیلوس آنفلوآنزا .

۲. به‌مازه د رفم ذکور د رفاول ویه یا گوند **بضیف وراثت** لک وید ااع داد عربی می آی دمانند د: **EcoK** ري **Ecoli** سه ویه **K**، **Hind** براي **H.influenza** سوبه د **Sau 3A** راي اسد فایلو کوک اورئوس **3A** نابع رخ ارج کروم و زومي مانند دوی روس یا یلاسین به همین صورت متعاقب اسم مذکور آورده میشود مانند: **EcoRI** و **EcoPI**.

۳- متعاقب آن بدون در نظر گرفتن فاصله، اعداد رومانی (I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X) برای تعیین آنزیم های مختلف که توسط همان سه ویه تولید می‌شوند مانند د HindIII و HindII.

۴- برای اختصاص دادن R.ENase یا M.MTase روی پلازمید، پلازمید را با استفاده از ریزیم و رار میگی ردوبالایک نقطه از آن فاصله میگرد مانند: R.EcoRI و M.EcoRI.

جدول شماره ۶- کد اسید های نوکلئیک جایگاه شناسایی آنزیم های محدود گر

| اسید نوکلئیک | کد | اسید نوکلئیک | کد |
|--------------|----|--------------|----|
| A, C or T | H | G or A | R |
| A, C or G | V | C or T | Y |
| C, G or T | B | A or T | W |
| A, G or T | D | A or C | M |
| G, A, T or C | N | G or T | K |
| | | C or G | S |

جدول شماره ۷- The Universal genetic code

| | | | | | Third position (3' end) |
|---|------------|----------------------|--------------------------------------|------|---|
| U | C | • U • C • A • G A | • C • A • G • G • A • A • G • C • | | First • Second position position (5' end) First position (5' end) |
| | | | | | |
| U | Phe | Ser | Tyr | Cys | U |
| | Phe | Ser | Tyr | Cys | C |
| | Leu | Ser | Stop | Stop | A |
| | Leu | Ser | Stop | Trp | G |
| C | Leu | Pro | His | Arg | U |
| | Leu | Pro | His | Arg | C |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | A |
| | Leu | Pro | Gln | Arg | G |
| A | Ilu | Thr | Asn | Ser | U |
| | Ilu | Thr | Asn | Ser | C |
| | Ilu | Thr | Lys | Arg | A |
| | Met | Thr | Lys | Arg | G |
| G | Val | Ala | Asp | Gly | U |
| | Val | Ala | Asp | Gly | C |
| | Val | Ala | Glu | Gly | A |
| | Val | Ala | Glu | Gly | G |

AUG - رمز شروع کننده.

GUG - بندرت به عنوان رمز شروع کننده قرار میگیرد.

جدول شماره ۸- حروف رمز اسید های آمینه

| نام اسید آمینه | رمز يك حرفي | رمز سه حرفي | نام اسید آمینه | رمز يك حرفي | رمز سه حرفي |
|----------------|-------------|-------------|----------------|-------------|-------------|
| آلانین | A | Ala | لوسین | L | Leu |
| آرژنین | R | Arg | لیزین | K | Lys |
| آسپاراژین | N | Asn | متیونین | M | Met |
| آسپارتیک | D | Asp | فنیل آلانین | F | Phe |

| | | | | | |
|-----|---|------------|-----|---|-----------|
| Pro | P | پرولين | Cys | C | سیتئین |
| Ser | S | سیرین | Glu | E | گلو تامات |
| Thr | T | تیره اونین | Gln | Q | گلو تامین |
| Trp | W | تریپتوفان | Gly | G | گلیسین |
| Tyr | Y | تیروزین | His | H | هیستیدین |
| Val | V | والین | Ile | I | ایزولوسین |

درس نهم

۲۶- نشان دار کردن اسید های نوکلئیک

مقدمه بناندار کردن اسید های نوکلئیک: ول بزرگی در بیولوژی مولکولی ایجاد نمائون تکنیک برای تأیید کارهای مولکولی و همچنین غربالگری کلنی های باکتری حاوی پلاسمید نوترکیب (هیبریداسیون) استفاده میشود. انشا... در این کارگاه با روشهای نشاندار کردن اسید های نوکلئیک بصورت عملی آشنا خواهیم شد و روش هیبریدیزاسیون را عملاً انجام میدهیم. در اینجا مختصری از کارهایی که انجام خواهد شد توضیح داده میشود.

روشهای نشاندار کردن آنزیماتیک DNA :

Random - Primed Labeling

Nick Translation

سنتز پروب بکمک PCR.

در nick translation نوکلئیدهای نشاندار نشده با نوکلئیدهای نشاندار شده تعویض میشوند (بدنترجایی). در دو روش دیگر منجر به سنتز DNA جدید میشود. (Net synthesis)

۲۷- Random - primed labeling

در هیبریدیزاسیون علاوه بر اسید تفاده از پروب های نشاندار شده با رادیوایزوتوپها از گروه های تغییر یافته غیر رادیواکتیو مانند دی و تین یادگیر کسی ژن نیز استفاده میشود. این روش در سال ۱۹۸۴ و ۱۹۸۳ توسط Feinberg و Vogelstein ابداع گردید. نشاندار کردن توسط آنزیم klenow انجام میشود که قطعه بزرگ DNA پلمیراز I اشرشیاکلی میباشد. Klenow فاکتورهای اگزونوکلئاز 3' → 5' میباشد و لی برعکس دارای فعالیت اگزونوکلئاز 5' → 3' میباشد.

برای نشاندار کردن با روش Random - Priming اول DNA دو رشته ای (خطی) توسط حرارت دناتوره شده و سپس روی یخ سرد میشود تا مانع رناتوراسیون DNA شده و بصورت زنجیره های تک رشته ای باقی بماند. Supercoiled DNA مقدار کمتری نشاندار میشود چون Reannealing رشته هاسریعتر انجام میشود. بنا بر این مولکولهای DNA جلقوی باید قبل از نشاندار شدن بصورت خطی درآمده باشند تا عمل Labeling به مقدار زیاد انجام گیرد.

از قطعات كوچك DNA هگز ا نوكلئوتيدي با تواليهاي متفاوت به عنوان پرايمر (آغازگر) براي سنتز DNA بكمك يك آنزيم DNA پليمراز استفاده ميشود. مخلوط هگز ا نوكلئوتيدها به روش تصادفي - اتفاقي به DNA دناتوره شده هدف Anneal ميشوند. اين اليگونوكلئوتيدها در واكنش پليمراز بعدي به عنوان primer عمل ميكنند. سنتز پروب با اضافه كردن آنزيم پليمراز klenow و چهار دزوكسي نوكلئوتيد تري فسفات (كه حداقل يكي از آنها dUTP) با هاپتن نشاندار شده است) شروع ميشود. چون پرايمرها خاصيت تصادفي - اتفاقي دارند ميتوانند به همه مترادف هاي هدف اتصال يابند. در اثناي سنتز به روش Random - primed هر دو زنجيره DNA (رشته هاي مكمل DNA هدف) بعد از دناتوراسيون به عنوان الگو عمل ميكنند. غلظت زياد پرايمر مانع Reannealing دورشته الگو با يكديگر ميشود.

در اين روش به علت عمل پرايمر هاي کوتاه معمولاً رشته DNA نشاندار کوتاهتر از DNA الگو مي باشد. چون هر دو رشته DNA اصلي به عنوان Template عمل ميكنند رشته هاي پروب نشاندار نيز تا اندازه اي مكمل يكديگر هستند، بطوري كه قبل از هيبريديزاسيون لازم است دناتوره شوند.

از روش Random - primed براي نشاندار كردن قطعات DNA به مقدار چند نانوگرم تا چندين ميكروگرم استفاده ميشود. نشاندار شدن بعد از ۳۰-۶۰ دقيقه به حداكثر ميرسد و هنگام انكوباسيون طولاني ورود ماده نشاندار به رشته ثابت است. حساسيت هاپتن هايي مانند بيوتين و Digoxigenin از طريق Random priming تا ۱۰۰ فمتوگرم DNA ميباشد.

۲۸- Nick translation

اين روش اولين بار براي نشاندار كردن پروب با را ديوايزوتوپ توسط Rigny در سال ۱۹۷۷ ابداع گرديد. در اين روش عمل دو آنزيم DNase I و DNA polymerase I اشرشياكلي روي DNA دو رشته اي همزمان انجام ميگيرد. DNase I يك اندونوكلاز اختصاصي هيدروليز كننده باند هاي فسفودي استر رشته هاي DNA ميباشد. اين عمل منجر به ايجاد اليگونوكلئوتيدهاي کوتاه حاوي ۵ فسفات ميشود. عمل آنزيم روي هر رشته DNA مستقيماً و در حضور يون Mg^{2+} انجام ميگيرد و شكافهاي در DNA يك رشته اي بوجود مي آورد كه تعداد آنها به غلظت DNase I در مخلوط انكوباسيون بستگي دارد.

اين عمل با غلظت پايين DNase I هم انجام ميشود. در اين شرايط فقط تعداد كمي Nick در هر زنجير DNA به وجود ميآيد. آنزيم DNA Polymerase I داراي سه فعاليت كاتاليتيك مستقل يعني پليمرازي ۵' → ۳', اگزونوكلازي ۳' → ۵' و اگزونوكلازي ۳' → ۵' ميباشد.

فعاليت نوكلنازي ۵' → ۳' آنزيم باعث حذف دزوكسي نوكلئوتيدها از انتهاي 5' فسفات ميشود، با فعاليت پليمرازي ۵' → ۳' آن، آنزيم مذکور بطور همزمان نوكلئوتيد تري فسفات را به انتهاي ۳' -OH آزاد شكاف (Nick) اضافه ميکند. اگر دزوكسي نوكلئوتيد تري فسفات هاي همراه دزوكسي نوكلئوتيد تري فسفات هاي تغيير يافته با هاپتن در مخلوط واكنش باشند در اثناي واكنش پليمريزاسيون هاپتن وارد زنجيره ميشود. چون عمل DNA Polymerase I وابسته به DNA الگو است مترادف نوكلئوتيدي هنگام Nick translation بدون تغيير با قي ميماند.

۲۹- نشاندار كردن DNA توسط PCR

PCR يك روش توانمند براي سنتز پروبهاي DNA (DNA بدون وكتور) مي باشد اين روش در سال ۱۹۸۴ توسط موليس ابداع گرديد و براي كارهايي مانند تكميل، Cloning، Sequencing و سنتز پروب بكار گرفته شد. در اين روش دو پرايمر حاوي دزوكسي نوكلئوتيد تري فسفات هاي نشاندار شده در پليمريزاسيون DNA شركت ميكنند. PCR توسط يك DNA پليمراز گرمادوست-مانند Taq انجام ميشود. واكنش Amplification در ۳۰ سيكل حرارتي در سه مرحله دناتوراسيون، Annealing و Extenssion انجام ميگيرد.

۳۰- هيبريديزاسيون Hybridization

DNA دو رشته اي محلول تحت تاثير حرارت دناتوره ميشود. اگر حرارت در حد T_m مولكول DNA باشد دناتوراسيون برگشت ناپذير است يعني رشته هاي DNA در محيط سرما جدا از يكديگر باقي ميمانند. T_m يك مولكول DNA دو رشته اي ايستايي DNA در حرارت مي باشد (Function of the Thermal Stability). در يك DNA هومولوگ اين پديده انعكاس نسبت با زها يعني محتوي G+C موجود در DNA ميباشد. G و C با سه اتصال هيدروژني بهم متصل ميشوند در حاليكه A و T با دو اتصال بهم مربوط ميشوند T_m

مولکول DNA تحت تاثیر قدرت یونی محیط (با افزایش یونها Tm بالا می‌رود)، حضور یونها (Mg^{+2})، پلی ساکاریدها، پرتئین و حلال‌های آلی (Formamide) قرار می‌گیرد.

رشته‌های DNA دو رشته‌ای دنا توره شده در حرارت کمتر از Tm خود بخود بهم چسبیده و نهایتاً با DNA مکمل خود یک هیبرید پایدار تشکیل می‌دهند بنا بر این واکنش از کینتیک ثانوی (Second- Order Kinetics) تبعیت میکند. هیبریدیزاسیون نیز شبیه Tm تحت تاثیر فاکتورهایی مانند قدرت یونی و حلال‌های آلی قرار می‌گیرد. اصطلاح Stringency در این مورد مفهوم مهمی است اما همه این فاکتورها (حرارت، غلظت نمک، وجود حلال‌های آلی) را در بر نمی‌گیرد. در شرایط Stringency پایین (نمک زیاد و حرارت کم) DNA های با شباهت کمتر با همدیگر هیبرید میشوند. در صورتیکه در Stringency بالا (غلظت کم نمک و حرارت بالا در حضور فرماید-Hybridization) فقط بین دو DNA با همولوژی بالا اتفاق می‌افتد. در این شرایط حرارت Hybridization ۲۰-۳۰ درجه پایین تر از (melting temperature) است. برای انجام Hybridization باید DNA هدف را روی یک پشتیبان جامد منتقل نمود تا DNA نشاندار (بصورت محلول) با DNA هدف هیبرید تشکیل دهند. در ساترن بلات DNA یا RNA روی ژل آگارز الکتروفورز میشوند و سپس روی غشای نیتروسلولز یا نایلونی منتقل می‌گردند. از مواد پشتیبان کننده دیگر مانند سلولز فعال، سفاریل، پلی استیرن یا بیدهای مگنیتیک نیز میتوان استفاده نمود.

پارامترهای Hybridization

پایداری هیبرید:

تشکیل هیبریدهای اسید نوکلئیک یک پروسه برگشت پذیر است. Tm عبارت است از حرارتی که نصف مولکول‌های DNA دوپلکس به تگ رشته تبدیل میشوند و تحت تاثیر غلظت نمک کاتیون‌های یک ظرفیتی (مول بر لیتر) تعداد نوکلئوتیدهای زنجیره، ترکیب بازها (که با G+C بیان میشود) و غلظت عوامل ناپایدار کننده هلیکس مانند Formamide قرار می‌گیرد.

کینتیک هیبریدیزاسیون پروبهای تگ رشته‌ای (Riboprobe):

میزان تشکیل هیبرید برای پروبهای تگ رشته‌ای از کینتیک اولیه (First - Order Kinetics) تبعیت میکند زیرا تقریباً همیشه غلظت پروب بیشتر از DNA Target است، بالاترین میزان هیبریدیزاسیون در محلول بصورت تجربی مشخص میشود. درجه Tm در دوپلکس DNA-DNA ۱۵ درجه کمتر از دوپلکس RNA-DNA است.

غلظت کاتیون (M) تاثیر کمتری روی میزان (Constant) (rate) ثابت هیبریدیزاسیون DNA-DNA دارد. میزان هیبریدیزاسیون تحت تاثیر قدرت یونی پایین قرار می‌گیرد. هیبریدیزاسیون در ۱ M NaCl هفت برابر بیشتر از ۰.۱۸ M NaCl انجام می‌گیرد. کاهش غلظت نمک در حد ۰.۰۹ M NaCl تا ۵ برابر میزان هیبریدیزاسیون را کاهش میدهد. تاثیر نمک روی تشکیل دوپلکس RNA-DNA تا اندازه‌ای با آنچه ذکر شد اختلاف دارد. در ۰.۱ M NaCl تشکیل DNA-RNA همسنگ DNA-DNA (Equivalent) است ولی در ۱ M NaCl میزان تشکیل دوپلکس RNA-DNA دوبرابر ۰.۱۸ M است.

کینتیک هیبریدیزاسیون در پروبهای دو رشته‌ای (DNA)

در پروبهای دو رشته‌ای هیبریدیزاسیون از کینتیک ثانویه (Second - Order Kinetics) تبعیت میکند. این پروب‌های توانمند با اسیدهای نوکلئیک ثابت شده روی فیلتر هیبرید شوند و یادر محلول دوباره Renature گردند. در نتیجه هیبریدیزاسیون ۵ برابر آهسته تر از پروبهای تگ رشته‌ای انجام می‌گیرد.

پلیمرهای دکستران آنیونی (دکستران سولفات ۵۰۰) یا پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ اتصال دو رشته پروب را در محلول به همدیگر تشدید میکنند. دکستران سولفات محلول را از DNA خارج میکند بنا براین غلظت موثر DNA افزایش مییابد. اثر دکستران سولفات برای پلی نوکلئوتیدهای بیشتر از 250bp مشهودتر است و روی الیگونوکلئوتیدها تاثیری ندارد.

وقتی از پروبهای تگ رشته‌ای استفاده میشود هیبریدیزاسیون تا سه برابر افزایش میابد و وقتی از Nick translated probe استفاده شود تا ۱۰۰ برابر میشود. مولکول‌هایی که از طریق Nick translation نشاندار شده‌اند دکستران سولفات تشکیل شبکه پروب (probe) را

hyper polymer network) یا هاراتسریع نمیکند و تاکید میشود که تشکیل چنین شبکه‌هایی به اندازه پرو ب بستگی دارد. خاطر نشان میسازد که اگر دکستران سولفات در محیط نباشد background های غیر اختصاصی زیاد میشوند.

روش کار:

Labeling (نشاندار کردن DNA و RNA)

برای نشاندار کردن قطعه DNA (پروب) از کیت Labeling Random Primed DNA شرکت Molecular Roch Biochemicals که با سیستم Digoxigenin (غیر رادیواکتیو) کار میکند استفاده میشود. دیگوکسی ژنین یک هاپتن استروئیدی است که DNA، RNA و الیگونوکلئوتیدها را جهت Hybridization نشاندار میکند. و ظهور (Detection) آن بصورت کالریمتری انجام میشود. برای نشاندار کردن DNA، دیگوکسی ژنین از طریق اتصال استری وارد dUTP میشود،

اتصال فوق در برابر قلیا (alkali) ناپایدار بوده و این یک امتیازی است که DIG - ۱۱ - dUTP به آسانی توسط قلیا از رشته مکمل روی Filter (کاغذ نیتروسولوز یا غشا نایلون) شسته شده و میتوان دوباره از فیلتر برای هیبریدیزاسیون با پرو ب دیگر استفاده نمود.

- DNA را مدت ۱۰ دقیقه در آبجوش قرار داده دهید تا به DNA Single strand تبدیل شود و بلافاصله آن را روی یخ حاوی نمک منتقل کنید و مواد زیر را به آن اضافه نمایید.

- ۲ میکرولیتر از مخلوط هگزانوکلئوتیدها

- ۲ میکرولیتر مخلوط dNTP

- آب مقطر تا حجم ۱۹ میکرولیتر

- ۱ میکرولیتر آنزیم klenow

با دست به ته لوله ضربه بزنید تا مواد داخل لوله مخلوط شوند مختصری سانتریفوژ کنید (spin quick)

- مدت ۲۴ ساعت (O/N) در ۳۷ درجه قرار دهید.

- واکنش را با EDTA متوقف کرده و برای پرسپیتاسیون LiCl با غلظت نهایی ۰.۵ M به آن اضافه کنید

- رسوب حاصل را در ۵۰ میکرولیتر بافر TE حل کنید.

- برای کنترل Labeling یک واکنش نیز با DNA کنترل موجود در کیت انجام دهید.

بررسی کمی و کیفی پروب نشاندار شده:

از پروب نشاندار شده رقت سریال (۱/۱۰، ۱/۱۰۰، ۱/۱۰۰۰) تهیه کنید (به هر یک از ویالها ۹ میکرولیتر آب اضافه کرده سپس یک میکرولیتر از پروب به لوله اول اضافه کرده و خوب مخلوط کنید و همینطور یک میکرولیتر از لوله اول به لوله دوم منتقل کنید و.....)

با انجام Dot blot روی نایلون یا نیتروسولوز آنها را ظاهر (detect) کنید.

- پس از انجام (dot) لکه‌گذاری قبل از اینکه لکه‌ها کاملاً خشک شوند توسط UV Crosslinker (مقدار ۱۲۰۰۰ ژول انرژی) آنها را روی غشا ثابت کنید (وقتی DNA در معرض UV قرار گیرد تیمین موجود در آن با گروه‌های آمین روی سطح نایلون cross-link میشوند).

- نایلون را مدت ۱۰ دقیقه در بافر I قرار دهید.

غشا را مدت ۱ ساعت دریا فر II قرار دهید تا فیلتر block شود (جاهائیکه DNA وجود ندارد توسط BSA پوشیده block) میشود تا آنتی بادی نتواند روی غشا بچسبد)

- غشا را مدت ۲۰ دقیقه در Dig Anti بارقت ۱/۵۰۰۰ قرار دهید.

- غشا را چند دفعه با بافر I شستشو داده تا آنتی بادی‌های متصل نشده از روی فیلتر حذف شوند.

- غشا را با بافر III شستشو دهید

- لکه‌های روی غشا را با Tetrazolium (NBT Nitro Blue) و Bromo Chloro Indolyl Phosphate (BCIP) ظاهر کنید

- با مقایسه رنگ لکه‌ها با رنگ لکه DNA کنترل نشاندار شده موجود در کیت مقدار پروب نشاندار شده را محاسبه کنید). هر میکروگرم DNA کنترل حاوی ... نانوگرم DNA نشاندار شده میباشد.

تهیه Riboprobe

ریبوپروب هاز رونویسی اختصاصی یکی از پروموتورهای T3 ، T7 یا SP6 که در نزدیک DNA کلون شده در یک Vector مناسب قرار دارند تهیه میشوند. معمولاً از پلاسمید Bluescript که پروموتورهای T3 و T7 در دو طرف MCS آن قرار دارند استفاده میشود (قطعه پروب باید در پلاسمید Bluescript.sk کلون شده باشد).

برای تهیه Riboprobe پلاسمید نوترکیب را توسط یک Restriction.Enzyme مناسب برش داده تا بصورت خطی دربیاید و برحسب اینکه قطعه کلون شده در Down stream کدامیک از پروموتورها قرار گرفته باشد پروموتور را توسط polymerase RNA اختصاصی آن فعال کنید تا از قطعه DNA کلون شده در پلاسمید از طریق off Synthesis RUN در لوله آزمایش RNA سنتز شود.

برای تهیه ریبوپروب از کیت (RNA Labeling and Detection Kit) شرکت Roch Molecular Biochemicals استفاده میشود. این کیت از طریق Run Off Synthesis از DNA معینی که در پلاسمید مخصوصی کلون شده است (الگو) RNA سنتز میکند. به ازای هر ۲۵-۲۰ نوکلئوتید یک مولکول Digoxigenin-11-UTP وارد رشته میشود. چون برای سنتز محدودیتی وجود ندارد مقدار زیادی RNA ساخته میشود. در شرایط استاندارد از هر یک میکروگرم DNA در حدود ۱۰ میکروگرم RNA رونویسی میشود. Riboprobe هایی که با این روش سنتز میشوند دارای خواص زیر هستند:

- دارای طول معینی بوده و اختصاصی و تک رشته‌ای می باشند.

شبهه probe DNA ها به یکدیگر متصل نمیشوند.

- اتصال Dig به UTP نسبت به NaOH مقاوم میباشد.

روش کار:

- مقدار ۱-۲ میکروگرم DNA را توسط Enzyne Restriction مناسب هضم (digest) کنید.

- بعد از اتمام واکنش آن را با P.C.I extroction کرده سپس با الکل رسوب دهید. (هرگز از RNase استفاده نکنید).

- ۲ میکرولیتر NTP به واکنش اضافه کنید.

- ۲ میکرولیتر ۱۰ Buffer X Transcription به آن اضافه کنید.

- ۱ میکرولیتر ((RNA ploymerase (T3, T7) به آن اضافه کنید.

- حجم واکنش را با آب مقطر به ۲۰ میکرولیتر برسانید.

- ۱ میکرولیتر RNasin (مهار کننده RNase) به واکنش اضافه کنید تا از فعالیت RNase احتمالی در واکنش جلوگیری کند.

- لوله را مختصری سانتریفیوژ (spin quick) نموده و ۲-۱ ساعت در ۳۷ درجه قرار دهید.

- واکنش را با EDTA متوقف نموده و برای رسوب دادن RNA از LiCl با غلظت نهایی ۰.۵ M استفاده کنید.

- بعد از شستشو با الکل ۷۰، رسوب را در ۱۰۰ میکرولیتر DEPC treated water حل کنید.

- مقدار ۱ میکرولیتر RNasin به آن اضافه کرده و ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه انکوبه کنید.

- کمیت پروب تولید شده شبیه DNA probe تعیین میشود فقط برای تهیه بافر II از DEPC treated water استفاده شود

- از RNA نشاندار شده موجود در کیت برای مقایسه پروبها استفاده کنید.

Hybridization

در این کارگاه برای هیبرید یزاسیون از دو روش Dot blot hybridization و Southern blot hybridization استفاده میکنیم.

روش دات بلات

- از DNA (قطعات DNA کلون شده) رقت سریال تهیه کنید و روی Nylon membrane لکهگذاری انجام دهید (Dot blotting).

- مدت ۵ دقیقه غشای نایلونی را در محلول Denaturing قرار دهید تا DNA دناتوره شود.

(لازم به ذکر است که نایلون نباید در محلول شناور شود بلکه باید ته ظرف یا سینی یک لایه کاغذ خشک کن قرار داده شود سپس محلول را روی کاغذ ریخته بطوری که فقط کاغذ خیس شود و سپس نایلون را روی آن قرار دهید.

- ۵ دقیقه غشا را مانند مرحله قبل در محلول Neutralizing قرار دهید تا غشا خنثی شده و از شکنندگی آن جلوگیری شود.

- غشا را روی کاغذ خشک کن قرار داده و هنگامیکه هنوز مرطوب است DNA را با Linker UV Cross روی آن ثابت کنید.

- غشا در این مرحله آماده است هم میتوان برای مدتی آن را نگهداری نمود و هم میتوان پروسه Hybridization را دنبال نمود.

روش ساترن بلات

DNA را با آنزیمهای Restriction مناسب هضم کنید و سپس آن را الکتروفورز نمایید. ظرفیت اتصال اسیدهای نوکلئیک به غشا نایلونی ۵۰۰ میکروگرم در هر سانتیمتر مربع میباشد و برای فیلتر نیتروسلولوز صد میکروگرم در هر سانتیمتر مربع است.

- وقتی الکتروفورز انجام شد ژل را با UV مشاهده کرده و برای جلوگیری از اصراف مواد قسمتهایی از ژل را که مورد استفاده نیست حذف کند (ژل را Trim کنید).

- گوشه (یکی از گوشه‌ها) ژل را علامت گذاری کرده و سپس ۹۰ دقیقه در حرارت اتاق آن را داخل محلول Denaturing دوران دهید تا DNA دناتوره شود (۰.۴ N NaOH) البته DNA های سنگین تر از ۱۵ kb را باید با محلول ۰.۲ M اسید کلریدریک Depurinate نمود تا بتوانند از ژل روی غشا منتقل شوند (این کار همراه با shaking انجام شود).

- واکنش را ۲۰ دقیقه در حرارت اتاق در محلول Neutratizing قرار دهید (همراه با shaking انجام گیرد).

- غشا (membrane Nylon) را به اندازه ژل بریده و گوشه آن را مانند ژل علامت گذاری کرده و سپس در آب دیونیزه آن را خیس کنید. (۹۸).

- بعد از آماده کردن تا نك انتقال (Transfer Tank) يك قطعه كاغذ صافي روي سيني تا نك قرار دهید.

- كاغذ صافي را حتما" بيافر تا نك خيس كنيد كه حباب هوا در آن قرار نگیرد.

- يك لايه كاغذ واتمن MM۳ روي آن قرار دهید بطوري كه دو سر كاغذ دريا فر تا نك قرار گیرد.

- ژل را بصورت وارونه (نسبت به موقعي كه الكتروفورز ميشود) روي كاغذ واتمن قرار داده بطوري كه زیر ژل حباب هوا قرار نگیرد.

- نایلون آماده شده را روی ژل قرار دهید بطوریکه هوا زیر آن نفوذ نکند.

- يك لايه كاغذ واتمن روي فيلتر قرار دهید.

- اطراف آن را با پارافيلم خوب بپوشانید.

- يك لايه كاغذ صافي و سپس چندین لايه كاغذ خشك كن روي آن قرار دهید بطوري كه مایع را جذب کند.

- يك صفحه شیشه اي روي آن قرار دهید و يك وزنه ۵۰۰ گرمي روي شیشه مستقر کنید.

- اطراف تا نك را با نایلون بپوشانید که تبا دل هوا با خارج انجام نگیرد و از تبخیر یافر تا نك ممانعت نماید.

- براي بافر تا نك از محلول ۰.۴ NaOH استفاده كنید زیرا براي Nylon بهتر از كاغذ نيتروسلولز میباشد و موجب دناتوره شدن و ثابت شدن DNA روي نایلون میشود.

- مدت ۲۴-۴ ساعت در هوای اتاق قرار دهید.

- نایلون را خارج کرده و با SSC X۲ بشوئید تا ذرات ژل از روی آن حذف شوند.

- وقتي نایلون هنوز نمدار است DNA را با دستگاه crosslinker UV روي آن ثابت کنید.

Pre hybridization (دات پلات یا ساترن پلات)

- غشای داخل کیسه پلاستیکی (bag Hybridization) قرار داده و مقدار ۲۰ ml/100cm^۲ محلول Prehybridization داخل کیسه ریخته و سپس آن را خوب درز گیری کنید بطوریکه مایع از آن نفوذ نکند (seal شود).

- مدت ۲-۱/۵ ساعت در ۴۲ درجه قرار دهید (برای ریبوپروب حرارت ۵۰ درجه در نظر گرفته شود)

- پروب را مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار داده تا دناتوره شود

- بلافاصله روی یخ حاوی نمک قرار دهید.

- یکی از گوشه های کیسه پلاستیکی حاوی nylon را بریده و آن را روی کاغذ خشک کن قرار داده و با چرخاندن یک مداد یا میله شیشه ای گرد روی آن ، محلول Prehyridization را از آن خارج کنید.

- مقدار ۲.۵ ml/100cm^۲ پروب مخلوط شده با محلول Hybridization وارد کیسه کنید.

- هوای آن را خارج کرده دوباره آن را seal کنید.

- مدت یک شب آن را در ۴۲ درجه قرار دهید. (برای ریبوپروب ۵۰ درجه).

Post hybridization

- نایلون را از کیسه خارج کنید.

- مدت ۵ دقیقه با محلول ۲ SDS , 1% XSSC همراه shaking در حرارت اطاق نایلون را بشوئید.

- مدت ۱۵ دقیقه با محلول ۲ SDS , 1% XSSC آن را بشوئید (RT)

- مدت ۳۰ دقیقه با محلول ۲ SDS , 1% XSSC در ۶۵ درجه شستشو دهید.

- Detection آن شبیه پروب انجام میگیرد.

هیبریدیزاسیون با Riboprobe

- مراحل blot Dot یا blot Southern شبیه DNA پروب انجام میگیرد.

- دمایی Hybridization را ۵۰ درجه در نظر بگیرید.

- بهتر است پروب (RNA) را هنگام استفاده مدت ۵ دقیقه در آب جوش قرار دهید تا چنانچه RNA دایره (Loop) تشکیل داده است باز شود.

- مراحل شستشو و Detection نیز شبیه DNA انجام میگیرد.

- باید دقت نمود که حین پروسه کار Rnase وارد محیط نشود و از تماس دست یا با وسایل کار و نمونه خودداری شود.

- حتماً از دستکش استفاده کنید

- وسایل شیشه ای، تیپها و محلول هارا باید از آلوده شدن با RNase محافظت نمود.

- مواد و وسایل کار با RNA باید از وسایل و مواد دیگر جدا باشند. وسایل شیشه ای بعد از شستشویا بد در محلول ۱/۰ درصد DEPC شناور شوند و سپس اتوکلاو گردند و بعد از آن مدت ۳ ساعت در ۲۵۰ درجه قرار گیرند.

تیپها ، لوله های سانتریفیوژ و لوله های فالکن فاقد RNase میباشد ولی با یداتوکلاو شوند.

DEPC ماده مهار کننده غیر اختصاصی ریبونوکلاز میباشد که با آدنین موجود در RNA واکنش میدهد.

تهیه Formamide Deionized

یکی از مشکلات در hybridization Riboprobe تجزیه شدن RNA توسط آلوده کننده‌ها یا موجود در Formamide میباشد برای جلوگیری از این عمل باید فرمامید دیونیزه شود.

روش کار:

- برای دیونیزه کردن فرمامید احتیاج به رزین (Ionexchanger) میباشد. از کاتیون (Carboxymethyl) و آنیون (Diethylaminoethyl) DEAE استفاده میشود.

- کاتیون و آنیون (از هر کدام ۵ گرم) جداگانه بایک لیتر آب Equilibrate میشوند. بعد از مخلوط شدن محلول ابری مانند تشکیل میگردد. این محلول را با دستگاه فیلتراسیون در خلا فیلتر (کاغذ صافی واتمن) کرده تا آب رزین خارج شده و رزین روی فیلتر باقی بماند و خشک شود سپس با یک لیتر فرمامید ۳۰ دقیقه روی همزن میچرخد تا خوب مخلوط شود. محلول دوباره با دستگاه فیلتراسیون در خلا با کاغذ صافی واتمن فیلتر میشود بطوری که یک محلول صاف تشکیل میگردد. این محلول Formamide Deionized در یخچال نگهداری میشود.

طرز تهیه بافرها:

الف) بافرهای Detection (ظهور) :

۱- بافر I:

| | |
|-------|---------------|
| 100mM | Tris (PH:7.5) |
| 500mM | NaCl |

۲- بافر II :

BSA (blocking reagent) 1-3% که در بافر I ۶۵ درجه حرارت داده میشود تا حل شود

۳- بافر III:

| | |
|-------|---------------|
| 100mM | Tris (pH:9.5) |
| 100mM | NaCl |
| 50mM | MgCl2 |

ب) بافرهای Hybridization :

۱- بافر Pre hybridization :

| | |
|----------|---------------------|
| 50% | Deionized formamide |
| SSC | 5X |
| 5X | Denhardtts |
| 50mM | hosphate buffer |
| 125mg/ml | SS DNA |

٢- بافر Hybridization :

| | |
|---------|---------------------|
| 50% | Deionized formamide |
| SSC | 5X |
| 1X | Denhardtts |
| 20mM | Phosphat buffer |
| 25mg/ml | SS DNA |
| 10% | Dextran sulfate |

٣- محلول Denhardtts :

| | |
|----|----------------------|
| 1% | BSA |
| 1% | Ficoll |
| 1% | Polyvinyl pyrolidone |

٤- بافر 20X SSC :

| | |
|----|------------|
| 3M | NaCl |
| 3M | Na Citrate |
| | pH: 7 |